



Nanotubes de carbone ultracourts pour la bioimagerie

Romain Faes

► To cite this version:

Romain Faes. Nanotubes de carbone ultracourts pour la bioimagerie. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0035 . tel-01134572

HAL Id: tel-01134572

<https://theses.hal.science/tel-01134572>

Submitted on 23 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE - PHYSIQUE

Par Romain FAES

**NANOTUBES DE CARBONE ULTRACOURTS
POUR LA BIOIMAGERIE**

Sous la direction de : Philippe POULIN et Christèle JAILLET-BARTHOLOME

Soutenue le 18 Février 2014

Membres du jury :

M. CAMPIDELLI Stéphane	Chargé de recherche	CEA	Président
M. DORIS Eric	Directeur de recherche	CEA	Rapporteur
M. FLAHAUT Emmanuel	Directeur de recherche	CNRS	Rapporteur
M. COGNET Laurent	Directeur de recherche	CNRS	Examineur
Mme JAILLET-BARTHOLOME Christèle	Maître de Conférences	Univ. Bordeaux	Directrice de thèse
M. POULIN Philippe	Directeur de recherche	CNRS	Directeur de thèse
M. RICHETTI Philippe	Directeur de recherche	CNRS	Invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Richetti pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherche Paul Pascal pendant mes trois années de thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Emmanuel Flahaut et Eric Doris d'avoir accepté de rapporter cette thèse, ainsi qu'aux membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

Un grand merci à Philippe Poulin et Christèle Jaillet mes deux directeurs de thèse avec qui j'ai pris plaisir à travailler pendant ces trois années au sein de l'équipe NTG. Je tiens à vous remercier pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur les nanotubes de carbone ultracourts, un sujet passionnant et pluridisciplinaire faisant intervenir de nombreux acteurs et savoir-faire. Vous m'avez permis d'évoluer dans un environnement propice à un réel épanouissement personnel et professionnel. Merci à vous !

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux personnes auprès desquelles j'ai pu trouver une aide précieuse pour le bon déroulement de ma thèse, Alain Pénicaud et Eric Anglaret (pour leurs bons conseils sur la spectroscopie Raman), Cécile Zakri, Jean-Paul Salvetat, Isabelle Ly (pour la microscopie électronique), Patrick Snabre, Will Néri (pour sa créativité et son sens pratique), Brigitte Delord, Alain Derré (pour l'ATG), Sébastien Gounel (pour les gels d'électrophorèse sur lesquels nous avons passé pas mal de temps) et Hassan Saadaoui (pour les nombreuses heures passées sur mes petits nanotubes dans la froideur de la salle d'AFM).

Je remercie à cette occasion Laurent Cognet, Brahim Lounis, Laura Oudjedi, Zhenghong Gao et Pierre Vermeulen du LP2N pour les tests photothermiques effectués avec mes solutions, prometteurs pour la suite.

Je remercie tous particulièrement les personnes indispensables au bon fonctionnement du CRPP : le service informatique, la cellule instrumentation, l'atelier mécanique, le service gestion (un grand merci à Elisabeth et Béatrice) et la cellule chimie.

Enfin je tiens à remercier les non-permanents avec qui j'ai partagé ces trois années.

Tout d'abord Richa et Matthieu N., mes premiers camarades de bureau au CRPP avec qui j'ai passé mes premiers instants au laboratoire. Les longues discussions sur Miyazaki, les délires sur Raja Mustaq, les conseils sur les nombreuses façons d'utiliser Origin 8.2...

Je remercie également tout particulièrement la fine équipe de mon second bureau d'adoption (le A123, à la croisée des chemins) qui sont devenus des amis : Lolo, Fabiche et Anne-So, pour tous ces moments passés au laboratoire et en dehors (le Monseigneur, le CRPP Poker Tour, le Mølky, les sandwichs...). Un grand merci à vous !!

Je n'oublie pas mon ami Jo, grand fan du PSG (personne n'est parfait), pour les savants calculs de masse volumique, les pendus, et son goût partagé pour la bonne musique (Paul Parker inside), et Martin, pour les pauses café/cigarette impromptues et sa science du mouvement d'un corps lancé.

Merci à Ahmed (ou pas) pour les quelques séances de course à pied et de futsal, grand sportif que je suis...

Une pensée pour les nombreux « étrangers » qui ont égayé mon passage au CRPP et fait bosser mon anglais : le clan des italiens, avec Elisa, Franco, Sandra... (euh non, mais tu parles italien c'est tout comme ;-)), avec qui j'ai pu pousser la sérénade en manipant dans le labo, les vénézuéliens Camillo et Oscar, pour leur joie de vivre et leur bonne humeur communicative, Besira, Cintia, Shannon... Et évidemment Yu, le joyeux drille de notre équipe NTG, jamais avare de bons compliments ou de services rendus.

Un grand merci aux autres anciens ou actuels CRPPiens : Tatiana, Lulu, Max, Emilie, Damien B., Mélanie, Simon, Alexis, Eric, Damien T., Samy, Julien, Alan, Manu, Christophe, Céline, Amélie, et aussi Nico B., que j'avais entraperçu au laboratoire lors de mon arrivée, que j'ai recroisé au hasard d'une conférence en Pologne et reperdu là-bas entre deux Krupnik... Merci fufurne !

Je suis également très reconnaissant envers mes amis bordelais Thomas, Carole, Yannick, Jérémie et Cyril, de m'avoir supporté de plus ou moins loin tout au long de mon odyssée CRPPienne.

Pour finir, je remercie chaleureusement mes parents, ma sœur, ma belle famille (Michel, Nita et Sophie).

Et Marion pour ta patience, ta compréhension, ton soutien sans faille et tout le reste.

Table des matières

Introduction générale.....	1
CHAPITRE I : Etat de l'art et contexte	
1 Généralités sur les nanotubes de carbone.....	7
1.1 Structure générale des nanotubes de carbone.....	7
1.2 Structure d'un nanotube de carbone mono-paroi.....	7
1.3 Densité d'états	9
1.4 Transitions optiques.....	10
1.4.1 Modèle à un électron	10
1.4.2 Effets excitoniques	11
2 Propriétés optiques des nanotubes de carbone	12
2.1 Photoluminescence des nanotubes de carbone	12
2.1.1 Principe de la photoluminescence	12
2.1.2 Application aux nanotubes de carbone.....	12
• Cartographie de photoluminescence	13
2.2 Absorption des nanotubes de carbone	14
2.2.1 Section efficace d'absorption des nanotubes	16
2.2.2 Photothermie des nanotubes de carbone.....	16
3 Scission des nanotubes de carbone	17
3.1 Méthodes physiques	17
3.1.1 Broyage a billes.....	17
3.1.2 Sonication	19
3.2 Méthodes chimiques : oxydation	23
3.2.1 Ozonolyse	23
3.2.2 Traitements acides	24
• Acide sulfurique et permanganate de potassium	24
• Solution piranha	25
• Acide nitrique et oléum.....	26
• acide sulfurique et/ou acide nitrique.....	27
4 Séparation des nanotubes de carbone.....	28

4.1	Ultracentrifugation en gradient de densité.....	28
4.1.1	Selon le diamètre, la métallicité ou la chiralité	28
4.1.2	Selon la longueur	30
5	Fonctionnalisation des nanotubes de carbone	32
5.1	Fonctionnalisation non-covalente.....	32
5.2	Fonctionnalisation covalente	34
	• Amidation et estérification.....	35
6	Bilan du chapitre I.....	36
7	Bibliographie.....	36

Chapitre II : Matériels et méthodes pour la caractérisation de nanotubes de carbone ultracourts

1	Sonication.....	43
2	Analyse thermogravimétrique	43
3	Spectroscopie Raman	44
3.1	Principe.....	44
3.2	Application aux nanotubes de carbone.....	45
3.2.1	Les bandes RBM	47
3.2.2	La bande G ou les modes tangentiels.....	47
3.2.3	La bande D	48
3.2.4	La bande 2D.....	48
4	Microscopie à force atomique	49
4.1	Principe.....	49
4.2	Modes de mesure.....	50
4.2.1	Mode « contact »	50
4.2.2	Mode « tapping »	51
4.3	Préparation des échantillons de nanotubes.....	51
4.4	Influence de la pointe et correction des longueurs des nanotubes de carbone.....	52
5	Spectroscopie d'absorption.....	53
6	Electrophorèse	54
6.1	Principe.....	54
6.2	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives.....	54
6.2.1	Le support.....	54
6.2.2	Préparation des gels	55
6.2.3	Préparation des solutions tampon et bleu de dépôt	55

6.2.4	Préparation des échantillons.....	56
7	Méthode d'imagerie photothermique hétérodyne	56
7.1	Principe.....	56
7.2	Dispositif expérimental	57
7.2.1	Détection en configuration réflexion	58
7.2.2	Détection en configuration transmission	58
8	Bibliographie.....	59

Chapitre III : Obtention de nanotubes de carbone ultracourts

1	Introduction.....	63
2	Système sels biliaires.....	63
2.1	Protocole de préparation des échantillons	63
2.2	Séparation par ultracentrifugation en gradient de densité	66
2.3	Caractérisation des échantillons	68
2.3.1	Microscopie à force atomique.....	68
2.3.2	Spectroscopie Raman	70
2.3.3	Spectroscopie d'absorption.....	72
2.4	Optimisation du rendement en nanotubes ultracourts	76
2.4.1	Variation des paramètres d'application des ultrasons.....	76
2.4.1.1	Caractérisations des échantillons.....	76
	• Microscopie à force atomique.....	76
	• Spectroscopie Raman	79
	• Spectroscopie d'absorption.....	80
2.4.2	Oxydation des nanotubes de carbone.....	81
2.4.2.1	Protocole de préparation des CNTs.....	81
2.4.2.2	Caractérisations	82
	• Analyse thermogravimétrique.....	82
	• Microscopie a force atomique.....	83
	• Spectroscopie Raman	86
	• Spectroscopie d'absorption.....	87
3	Système CTAB.....	89
3.1	Généralités	89
3.2	Protocole de préparation des échantillons	90
3.3	Caractérisations.....	91

3.3.1	Microscopie à force atomique.....	91
3.3.2	Spectroscopie Raman	92
3.3.3	Spectroscopie d'absorption.....	93
4	Bilan du chapitre III.....	95
5	Bibliographie.....	95

Chapitre IV : Biofonctionnalisation de nanotubes de carbone

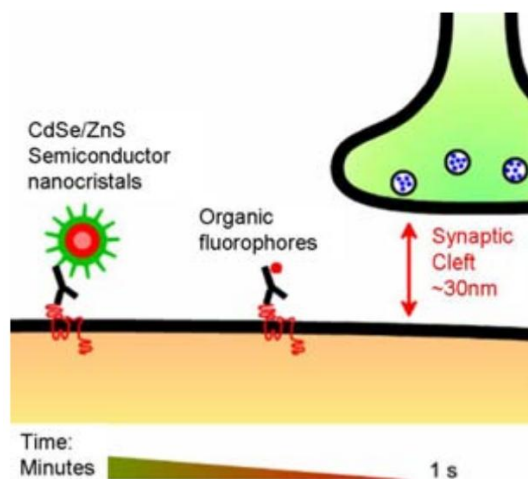
1	Introduction.....	98
2	Fonctionnalisation de SWCNTs oxydés par la biotine	98
2.1	Généralités	98
2.2	Protocole de couplage.....	99
2.3	Préparation des échantillons.....	100
2.4	Protocole de préparation des surfaces	101
2.5	Analyse des surfaces fonctionnalisées par photothermie	102
3	Fonctionnalisation de SWCNTs par un anticorps monoclonal	103
3.1	Généralités	103
3.2	Préparation des échantillons de CNTs oxydés	105
3.3	Protocole d'incubation des CNTs avec des cellules COS7	106
3.4	Analyses par méthode PHI	107
3.5	Préparation des échantillons de CNTs bruts	108
3.5.1	Système CTAB.....	108
3.5.2	Système SDS	109
3.5.3	Systèmes PE-PEG 920 et Brij 78.....	109
3.6	Analyses photothermiques.....	109
3.7	Fonctionnalisation de SWCNTs ultracourts.....	112
3.7.1	Protocole de couplage.....	112
3.7.2	Analyses photothermiques.....	113
4	Bilan du Chapitre IV.....	114
5	Bibliographie.....	115
	Conclusion et perspectives	117
	Annexes	119

Introduction générale

Contexte scientifique

L'observation directe de molécules individuelles [Weiss] dans des milieux aussi complexes que les cellules vivantes [Harms, Heine, Sako, Schutz, Tardin] est un développement important dans la microscopie optique moderne. Les méthodes pour détecter des molécules uniques ont changé notre façon de penser et nous permettent d'envisager des expériences sur des systèmes moléculaires plus complexes. Cependant, la détection optique d'une molécule unique reste difficile, car la résolution spatiale est limitée par la longueur d'onde de la lumière, de sorte que le signal doit être extrait du bruit de fond de milliards d'autres molécules dans la tache focale du microscope. Une manière élégante de résoudre ce problème est d'attacher un marqueur à la molécule d'intérêt. Le marqueur idéal doit répondre à des exigences contradictoires. Il doit générer un signal optique intense, mais en même temps être aussi petit que possible, afin de ne pas perturber la molécule observée trop sévèrement [Groc]. Plusieurs types de marqueurs optiques ont été développés et utilisés au cours des dernières années. Ainsi, l'organisation dynamique des synapses dans des neurones vivants a pu être étudiée par microscopie d'épifluorescence à l'aide de fluorophores uniques (molécules fluorescentes ou nanocristaux semiconducteurs de CdSe). Le signal de luminescence émis par le fluorophore permet d'observer, à cadence vidéo, les mouvements latéraux de récepteurs membranaires individuels à l'intérieur et à l'extérieur de la synapse [Cognet, Tardin]. Néanmoins, ces nano-objets fluorescents présentent certains inconvénients majeurs :

- Les molécules fluorescentes ont l'avantage d'être des marqueurs de très petite taille (environ 1 nm). Cependant, elles photoblanchissent de manière irréversible après quelques secondes d'illumination, entraînant la perte du signal [Tardin].
- Les nanocristaux semiconducteurs de CdSe/ZnS (environ 10-30 nm) sont quant à eux soumis au clignotement, ce qui donne des trajectoires tronquées qu'il faut reconstruire. De plus, l'encombrement des nanocristaux semiconducteurs est plus important que celui des marqueurs fluorescents, et cela peut les empêcher d'accéder à des environnements très confinés tels que la fente synaptique [Groc].



Différentes techniques d'étude en molécule unique utilisées pour la neurobiologie et ordres de grandeurs associés.

Une alternative au suivi de particules fluorescentes a été proposée par le groupe Nanophotonique de l'université Bordeaux 1 avec le dispositif d'imagerie photothermique hétérodyne (baptisée méthode « PHI » pour *Photothermal Heterodyne Imaging*) [Berciaud 2004]. Ce dispositif insensible au fond diffusant est très bien adapté à l'imagerie des cellules. Un dispositif de suivi de nanoparticules d'or individuelles via leur signal photothermique a été mis en place, il a permis de suivre des nanoparticules d'or de 5 nm dans des cellules vivantes [Lasne 2006]. La principale limitation au développement des techniques photothermiques pour les applications en biologie réside dans le fait qu'il existe un signal photothermique inhérent aux cellules et qui provient des mitochondries [Lasne 2007] pour une excitation proche de la résonance plasmon de surface des nanoparticules d'or (autour de 532 nm).

Dans ce contexte, de nouvelles stratégies de marquage reposant sur des nano-objets absorbants dans le proche infrarouge, dans la plage de transparence des tissus biologiques, semblent prometteuses. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le projet ANR *UshortNT*, qui a pour but d'imager la plasticité de récepteurs post-synaptiques par l'utilisation de nanotubes de carbone ultracourts biofonctionnalisés par des anticorps spécifiques. Les nanotubes de carbone apparaissent comme un matériau de choix car ils possèdent des propriétés optiques encourageantes pour ces applications. En effet, ils photoluminescent et possèdent une forte section efficace d'absorption comme nous le verrons par la suite [Berciaud 2007]. Cependant, le principal défi est de raccourcir les nanotubes de carbone car ils sont longs après synthèse (plusieurs μm). Nous développons dans ce manuscrit l'obtention de nanotubes de carbone courts et leur biofonctionnalisation pour servir de marqueur proche infrarouge. De tels marqueurs pourraient trouver des applications dans l'imagerie de la plasticité synaptique au sein de neurones vivants.

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres.

Le **chapitre I** présente quelques généralités sur les nanotubes de carbone et les moyens mis à notre disposition pour obtenir des nanotubes de carbone courts biofonctionnalisés pouvant servir de marqueur proche infrarouge.

Le **chapitre II** est consacré à la présentation des techniques mises en œuvre pour la caractérisation des nanotubes de carbone.

Le **chapitre III** montre la préparation et la caractérisation de nanotubes de carbone ultracourts d'une longueur inférieure à 20 nm.

Le **chapitre IV** présente la biofonctionnalisation de nanotubes de carbone et les tests photothermiques sur cellules mis en œuvre.

Une conclusion ainsi que des perspectives de poursuite de ce travail de thèse seront présentées à la fin de ce manuscrit.

Berciaud, S., Cognet, L., Blab, G. A. & Lounis, B. *Physical Review Letters* **93**, 257402 (2004).

Berciaud, S., Cognet, L., Poulin, P., Weisman, R. B. & Lounis, B. *Nano Letters* **7**, 1203–1207 (2007).

Cognet, L., Groc, L., Lounis, B. & Choquet, D. *Science's STKE*, 13 (2006).

Groc, L., Lafourcade, M., Heine, M., Renner, M., Racine, V., Sibarita, J-B., Lounis, B., Choquet, D. & Cognet, L. *The Journal of Neuroscience* **27**, 12433–12437 (2007).

Harms, G. S., Cognet, L., Bats, C., Lommerse, P. H., Blab, G. A., Kahr, H., Gamsjäger, R., Spaink, H. P., Soldatov, N. M., Romanin, C. & Schmidt, T. *Biophysical Journal* **81**, 2639–2646 (2001).

Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Béïque, J-C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Hukanir, R. L., Cognet, L. & Choquet, D. *Science* **320**, 201–205 (2008).

Lasne, D., Blab, G. A., Berciaud, S., Heine, M., Groc, L., Choquet, D., Cognet, L. & Lounis, B. *Biophysical Journal* **91**, 4598–4604 (2006).

Lasne, D., Blab, G. A., De Giorgi, F., Ichas, F., Lounis, B. & Cognet, L. *Optics Express* **15**, 14184–14193 (2007).

Sako, Y., Minoghchi, S. & Yanagida, T. *Nature Cell Biology* **2**, 168–172 (2000).

Schutz, G. J., Kada, G., Pastushenko, V. P. & Schindler, H. *Journal of the European Molecular Biology Organization* **19**, 892–901 (2000).

Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B. & Choquet, D. *Journal of the European Molecular Biology Organization* **22**, 4656–4665 (2003).

Weiss, S. *Science* **283**, 1676–1683 (1999).

Chapitre I

Etat de l'art et contexte

1	Généralités sur les nanotubes de carbone.....	7
1.1	Structure générale des nanotubes de carbone	7
1.2	Structure d'un nanotube de carbone mono-paroi.....	7
1.3	Densité d'états	9
1.4	Transitions optiques	10
1.4.1	Modèle à un électron.....	10
1.4.2	Effets excitoniques.....	11
2	Propriétés optiques des nanotubes de carbone.....	12
2.1	Photoluminescence des nanotubes de carbone	12
2.1.1	Principe de la photoluminescence.....	12
2.1.2	Application aux nanotubes de carbone	12
2.2	Absorption des nanotubes de carbone	14
2.2.1	Section efficace d'absorption des nanotubes	16
2.2.2	Photothermie des nanotubes de carbone.....	16
3	Scission des nanotubes de carbone	17
3.1	Méthodes physiques.....	17
3.1.1	Broyage a billes	17
3.1.2	Sonication.....	19
3.2	Méthodes chimiques : oxydation.....	23
3.2.1	Ozonolyse	23
3.2.2	Traitements acides	24
4	Séparation des nanotubes de carbone	28
4.1	Ultracentrifugation en gradient de densité.....	28
4.1.1	Selon le diamètre, la métallicité ou la chiralité.....	28

4.1.2	Selon la longueur	30
5	Fonctionnalisation des nanotubes de carbone	32
5.1	Fonctionnalisation non-covalente	32
5.2	Fonctionnalisation covalente.....	34
6	Bilan du chapitre I	36
7	Bibliographie	36

1 GENERALITES SUR LES NANOTUBES DE CARBONE

1.1 STRUCTURE GENERALE DES NANOTUBES DE CARBONE

Un nanotube de carbone peut être décrit comme un feuillet de graphène enroulé sur lui-même pour former un cylindre, terminé à chaque extrémité par un demi-fullerène. L'enroulement d'une feuille de graphène représente un nanotube de carbone mono-paroi (en anglais Single-Walled Carbon Nanotube, SWCNT). Si plusieurs nanotubes sont empilés de façon concentrique, on parle de nanotubes de carbone multi-parois (en anglais Multi-Walled Carbon Nanotube, MWCNT) (**Figure I-1**).

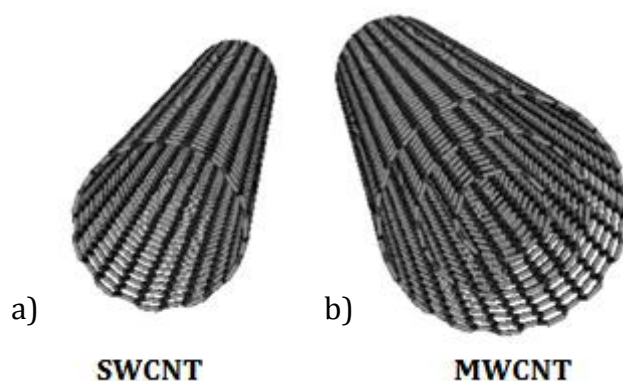


Figure I-1 : Représentation schématisée d'un nanotube a) mono-paroi b) multi-parois.

Les SWCNTs ont un diamètre compris entre 0,4 et 10 nm, la plupart étant inférieur à 2 nm [Saito 1998]. Leur longueur est en général de l'ordre du micron, mais peut atteindre plusieurs dizaines de centimètres selon les conditions de synthèse. Les nanotubes ont un très grand rapport d'aspect, de 10^3 à 10^5 , et peuvent être considérés comme des structures unidimensionnelles. La densité des SWCNTs est comprise entre 1,33 et 1,40 [Saito 1998].

Les MWCNTs ont un diamètre externe qui peut atteindre plusieurs dizaines de nanomètres. La distance entre chaque paroi est d'environ 3,4 Å, ce qui correspond à la distance entre deux plans de graphène dans le graphite. Les MWCNTs ont une densité de 1,8 [Shaffer].

1.2 STRUCTURE D'UN NANOTUBE DE CARBONE MONO-PAROI

Les nanotubes de carbone peuvent être classés selon le type d'enroulement, aussi appelé chiralité ou hélicité. La structure d'un nanotube de carbone peut être décrite par le vecteur chiral \vec{C} (schématisé sur la **Figure I-2 a)**) qui correspond à la section du nanotube perpendiculaire à l'axe de celui-ci. Un nanotube de carbone est formé en repliant la feuille de graphène de façon à faire coïncider deux sites cristallographiques équivalents liés par le

vecteur chiral \vec{C} . Ce vecteur peut être exprimé dans l'espace réel par une combinaison linéaire des vecteurs unitaires \vec{a}_1 et \vec{a}_2 du réseau de Bravais du feuillet de graphène :

$$\vec{C} = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2$$

où les indices de Hamata n et m sont des entiers naturels tels que $0 \leq m \leq n$.

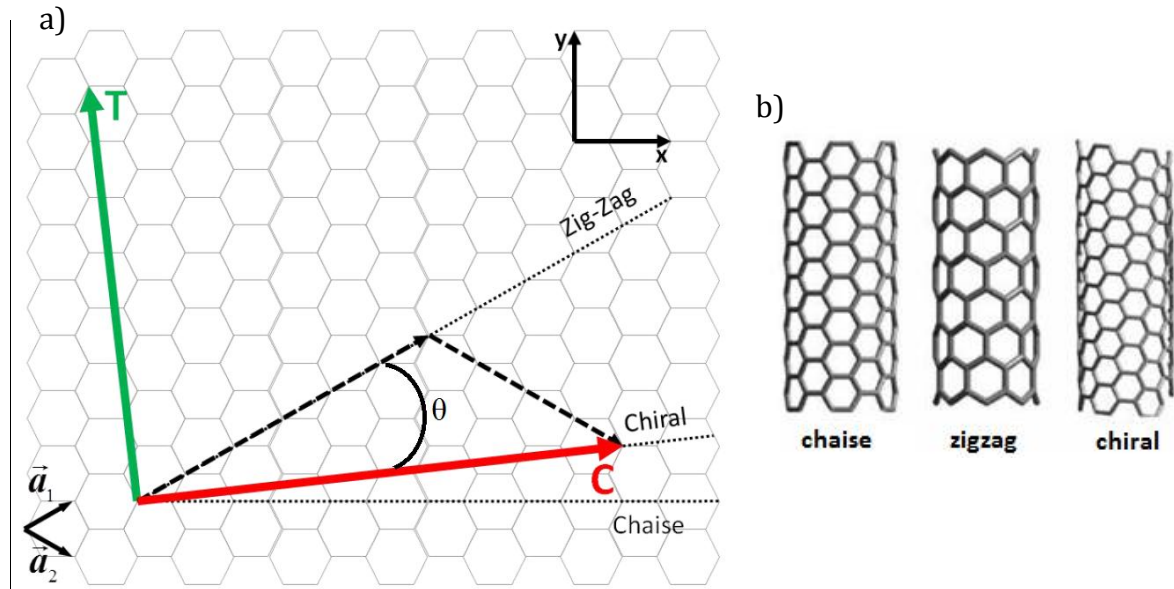


Figure I-2 : Représentation schématique a) d'un feuillet de graphène en 2D, du vecteur chiral \vec{C} d'un nanotube et de l'angle chiral θ , et b) des trois types d'enroulement (chaise, zigzag et chiral).

Il est également possible de définir un angle chiral θ qui correspond à l'angle d'enroulement de la structure hexagonale par rapport à l'axe du nanotube. Cet angle chiral θ correspond à l'angle formé par le vecteur chiral \vec{C} et le vecteur \vec{a}_1 . Les indices n et m sont directement reliés au diamètre d_t du nanotube et à l'angle d'hélicité θ par les relations suivantes :

$$d_t = \frac{|\vec{C}|}{\pi} = \frac{a\sqrt{n^2 + m^2 + nm}}{\pi}$$

où a est la constante du réseau valant ici 0,249 nm.

$$\theta = \arctan\left(\sqrt{\frac{m}{(2n + m)}}\right)$$

Trois familles structurales de nanotubes peuvent ainsi être définies selon leurs indices chiraux n et m (**Figure I-2 b**) :

- $n = m \rightarrow (n, n) \rightarrow \theta = 30^\circ$: nanotubes en conformation chaise (ou armchair)
- $m = 0 \rightarrow (n, 0) \rightarrow \theta = 0^\circ$: nanotubes en conformation zigzag
- $n \neq m \rightarrow (n, m) \rightarrow 0^\circ \leq |\theta| \leq 30^\circ$: nanotubes chiraux

Le vecteur translation \vec{T} est le vecteur élémentaire du nanotube de carbone 1D dans la direction orthogonale au vecteur chiral (donc parallèle à l'axe du nanotube). Il permet de définir la maille élémentaire du nanotube, donnée par le rectangle formé par les vecteurs \vec{C} et \vec{T} , et joint les deux premiers sites équivalents dans le réseau réel. A l'intérieur de cette maille il y a $2N$ atomes de carbone, N pouvant être calculé à partir de n et m par la relation :

$$N = \frac{2(n^2 + m^2 + nm)}{d_R}$$

où d_R est le plus grand diviseur commun de $(2m + n)$ et de $(2n + m)$.

Une relation simple entre les indices n et m et la structure énergétique des nanotubes a été trouvée [Saito 1998]. Ainsi un nanotube (n, m) est métallique si $2n + m$ est un multiple de 3, ou, de manière équivalente, si $n - m$ est un multiple de 3. Il sera semiconducteur dans tous les autres cas.

1.3 DENSITE D'ETATS

La densité d'état d'un objet unidimensionnel de longueur l , dans le cas d'une dispersion parabolique telle que les nanotubes de carbone mono-paroi, s'écrit :

$$D(E) = \frac{l}{2\pi} \sqrt{\frac{2m^*}{\hbar^2}} \frac{1}{\sqrt{E}}$$

où E est l'énergie, m^* est la masse effective de l'électron, \hbar la constante de Planck réduite, l'origine des énergies étant prise en bas de la bande de conduction.

La **Figure I-3** présente les densités d'états d'un nanotube de carbone semiconducteur et celles d'un nanotube métallique. Ces densités présentent les singularités en $1/\sqrt{E}$ caractéristiques de la nature 1D des nanotubes de carbone, appelées singularités de van Hove. La densité d'état est nulle au niveau de Fermi pour les nanotubes semiconducteurs

(bande d'énergie interdite). Au contraire, pour les nanotubes métalliques, la densité d'état est non nulle sur un intervalle centré sur le niveau de Fermi $E = 0$ (niveau d'énergie continu).

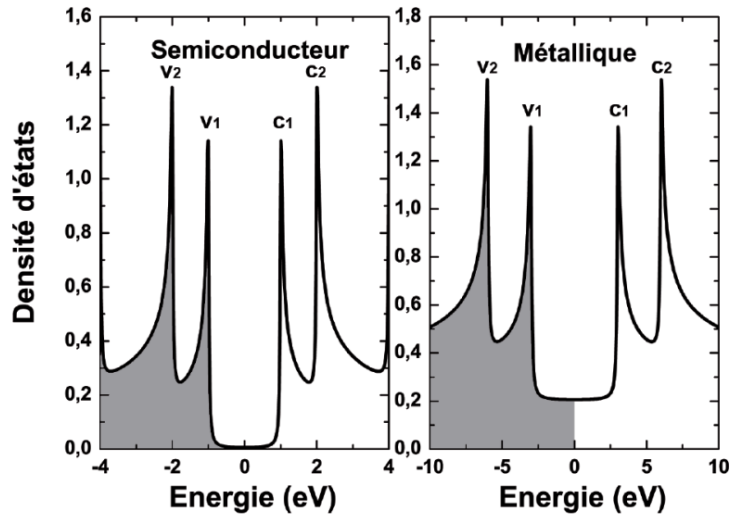


Figure I-3 : Densité d'état d'un nanotube semiconducteur et d'un nanotube métallique.

De manière générale, la bande interdite diminue quand le rayon des nanotubes augmente. Pour les MWCNTs, qui possèdent des diamètres beaucoup plus grands que les SWCNTs, la bande interdite des parois externes qui composent les MWCNTs est suffisamment faible pour qu'à température ambiante les électrons puissent passer aisément d'une bande à l'autre. De ce fait les MWCNTs sont métalliques.

1.4 TRANSITIONS OPTIQUES

1.4.1 MODELE A UN ELECTRON

Le spectre d'absorption optique d'un nanotube est dominé par des résonances optiques très prononcées au niveau des singularités de van Hove, où la densité d'états conjointe est maximale [Reich]. Les résonances optiques seront indexées en fonction de la nature et des bandes d'énergie qu'elles font intervenir. On notera ces transitions M_{ii} , $i = 1, 2, \dots$ pour les nanotubes métalliques et S_{ii} , $i = 1, 2, \dots$ pour les semiconducteurs.

Pour un nanotube semiconducteur, l'énergie de la transition S_{11} correspondant à l'énergie du gap séparant les deux premières singularités de van Hove s'écrit :

$$S_{11} = \frac{2\gamma_0 a}{\sqrt{3}d_t}$$

Avec γ_0 l'énergie d'interaction entre plus proche atomes de carbone voisins, a la constante du réseau et d_t le diamètre du nanotube.

Pour un nanotube métallique, l'énergie de la transition M_{11} s'écrit :

$$M_{11} = \frac{6\gamma_0 a}{\sqrt{3}d_t}$$

Pour une même valeur de d_t , l'énergie de la transition M_{11} d'un nanotube métallique est donc trois fois plus élevée que l'énergie de la transition S_{11} d'un nanotube semiconducteur.

1.4.2 EFFETS EXCITONIQUES

Le modèle développé précédemment donne une description des tendances générales et permet une vision semi-quantitative des énergies de transition mises en œuvre dans les SWCNTs. Cependant, des expériences ont montré des contradictions avec le modèle à un électron. En 2002, les groupes de Weisman et Smalley [Bachilo, O'Connell 2002] ont réalisé la première détection optique de SWCNTs individuels par la luminescence. Ils ont observé que le rapport entre les énergies de transition E_{22} et E_{11} était systématiquement inférieur au rapport prédit par le modèle à un électron [Hamada, Mintmire]. Ces observations ont été attribuées, entre 2002 et 2005, aux effets excitoniques qui avaient été théoriquement prédits en 1997 [Ando]. En effet, du fait du confinement unidimensionnel dans les SWCNTs, les effets d'écrantage de l'interaction coulombienne sont réduits. Ainsi, électrons et trous ne sont pas décorrelés et il est nécessaire d'introduire la notion d'exciton. Un exciton peut être décrit comme une quasi-particule constituée d'un électron et d'un trou liés par l'interaction coulombienne. L'exciton est caractérisé par son énergie de liaison E_b . Plus l'interaction entre l'électron et le trou est grande, plus la valeur de l'énergie de liaison de l'exciton augmente. Dans la structure de bande du nanotube, les niveaux excitoniques apparaissent comme des bandes supplémentaires en dessous du continuum correspondant à une singularité de van Hove à l'énergie $E_{gap} - E_b$.

En 2005, des mesures d'excitation de la photoluminescence à deux photons ont permis de démontrer expérimentalement l'existence d'excitons dans les nanotubes semiconducteurs [Wang 2005]. Ces mesures montrent que l'énergie de liaison est de l'ordre de 400 meV soit un tiers du gap calculé dans le modèle à un électron. Les effets excitoniques sont donc très forts dans les nanotubes semiconducteurs. L'énergie de liaison des excitons dans les nanotubes métalliques a été mesurée plus tardivement grâce à une technique de spectroscopie d'absorption directe sur nanotube individuel et est de l'ordre de 50 meV [Wang 2007]. Ainsi, malgré les effets d'écrantage, les énergies de liaison des excitons restent significatives dans les nanotubes métalliques.

2 PROPRIETES OPTIQUES DES NANOTUBES DE CARBONE

2.1 PHOTOLUMINESCENCE DES NANOTUBES DE CARBONE

2.1.1 PRINCIPE DE LA PHOTOLUMINESCENCE

Un nano-objet luminescent peut être modélisé schématiquement par un système à trois niveaux électroniques (**Figure I-4**). Cette approche très générale permet d'appréhender la photophysique d'une grande variété de nano-objets luminescents (molécules fluorescentes, nanocristaux semiconducteurs, nanotubes de carbone mono-paroi...). Avant l'excitation, la configuration électronique du système est dans son état fondamental $|f\rangle$. Après l'absorption d'un photon du faisceau d'excitation, le système est promu dans un état excité $|e'\rangle$. Le nano-objet ainsi excité relaxe alors rapidement vers le premier niveau excité le plus bas $|e\rangle$. A partir de cet état, le système retourne vers son état fondamental $|f\rangle$ via l'émission d'un photon de fluorescence (recombinaison radiative) ou par l'intermédiaire de processus non radiatifs.

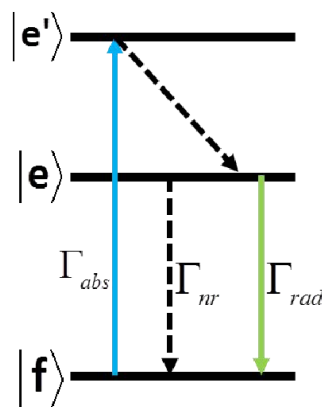


Figure I-4 : Diagramme d'énergie schématique d'un nano-objet individuel luminescent. Γ_{abs} est le taux d'absorption, Γ_{nr} est le taux de désexcitation non radiative et Γ_{rad} est le taux de désexcitation radiative.

2.1.2 APPLICATION AUX NANOTUBES DE CARBONE

La photoluminescence est possible seulement pour les nanotubes semiconducteurs. Le processus optique se déroule autour des deux premières singularités de van Hove (S_{11} et S_{22}) et est assisté par une dynamique excitonique comme présenté dans la **section 1.4.2 p. 11** de ce chapitre.

Les schémas de la **Figure I-5** décrivent le mécanisme de photoluminescence dans un nanotube semiconducteur. Les photons sont d'abord absorbés au niveau de la transition E_{22} dans les proportions de la section efficace d'absorption. Un certain nombre de paires électron-trou est alors créé au niveau de E_{11} après une relaxation extrêmement rapide (100 fs) depuis E_{22} . Une partie des excitons se désexcite alors de façon non radiative tandis que l'autre partie se désexcite en générant un photon.

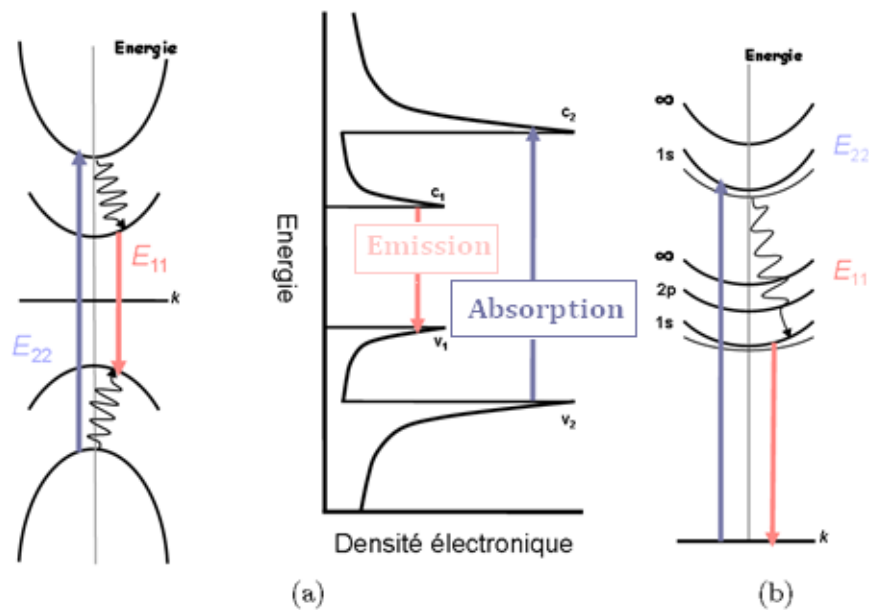


Figure I-5 : Mécanisme de photoluminescence dans les nanotubes de carbone. (a) Schéma simplifié de la structure de bande et des transitions optiques impliquées dans le mécanisme de photoluminescence. (b) Structure de bande simplifiée des excitons dans un nanotube.

- CARTOGRAPHIE DE PHOTOLUMINESCENCE

Les familles (n,m) de nanotubes possèdent des énergies d'absorption et d'émission spécifiques. Une façon de caractériser expérimentalement chaque énergie d'excitation et d'émission pour chaque type de nanotube est de faire une cartographie de photoluminescence. Pour cela on soumet l'ensemble des nanotubes au faisceau d'un laser d'excitation accordable. Pour chaque longueur d'onde d'excitation du laser, le spectre d'émission est enregistré (**Figure I-6**). Chaque pic d'intensité représente un couple de transition optique (absorption/émission) caractéristique d'une chiralité (n,m) de nanotube. Les valeurs théoriques du diagramme de Kataura (**Figure I-7 p. 14**) permettent d'assigner un pic à une chiralité. Ainsi par exemple le pic de photoluminescence situé à l'énergie d'excitation 567 nm et d'émission 975 nm est la contribution de l'émission de chaque nanotube (6,5).

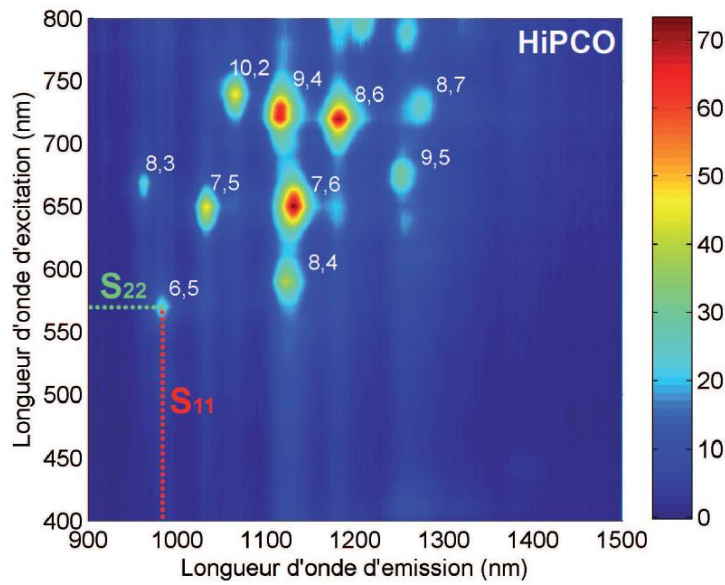


Figure I-6 : Carte d'excitation de la photoluminescence d'une suspension de nanotubes HiPCO stabilisés dans du cholate de sodium à 2% en masse. [Roquelet]

2.2 ABSORPTION DES NANOTUBES DE CARBONE

L'absorption de photons par les nanotubes de carbone est directement liée aux énergies de transitions électroniques décrites dans la **partie 1.4**. L'ensemble des transitions pour chaque nanotube (n, m) est présenté dans un diagramme de Kataura (**Figure I-7**).

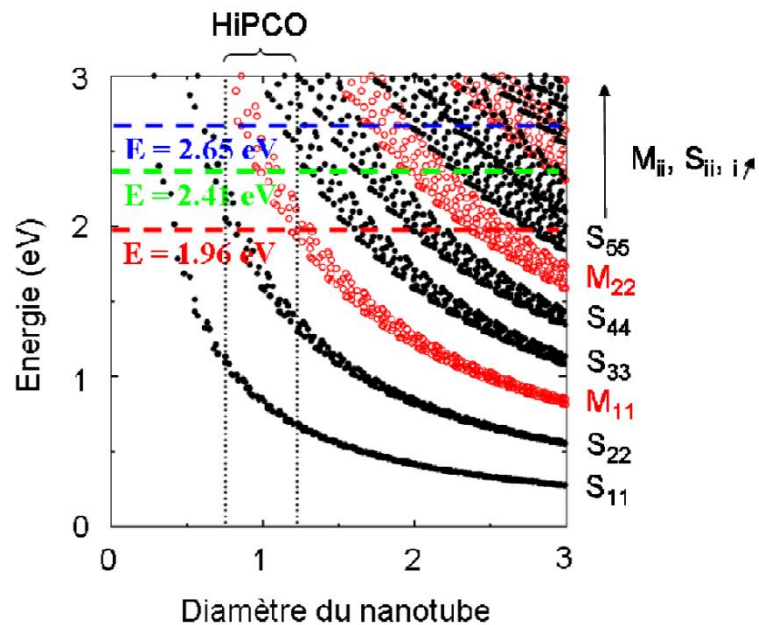


Figure I-7 : Diagramme de Kataura pour des nanotubes mono-paroi indiquant les nanotubes sondés et les bandes d'énergie mises en jeu pour trois longueurs d'onde : 468 nm ($E = 2,65$ eV), 514 nm ($E = 2,41$ eV), 632 nm ($E = 1,96$ eV). Les diamètres des nanotubes mono-paroi produits par synthèse HiPCO sont indiqués.

Les points rouges correspondent aux nanotubes métalliques et les points noirs aux nanotubes semiconducteurs. [Maruyama]

Chaque transition E_{ii} donne lieu à un pic d'absorption de photons. Ces pics d'absorption seront différents pour chaque nanotube (n, m) , suivant son diamètre ou sa métallicité. Le diagramme de Kataura permet de déterminer l'origine des pics d'absorption. On peut classer ces pics en fonction des énergies de transition des nanotubes.

La **Figure I-8** présente un spectre d'absorption d'une distribution (n, m) de nanotubes isolés.

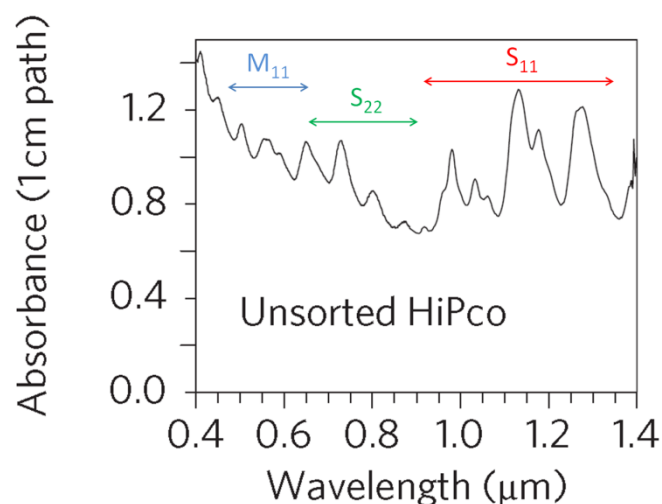


Figure I-8 : Spectre d'absorption d'une suspension de nanotubes de type HiPCO stabilisés dans du cholate de sodium à 2% en masse. [Gosh]

Par exemple, la première zone autour de 550 nm regroupe les pics d'absorption correspondant aux transitions des nanotubes métalliques notées M_{11} . Le groupe suivant, entre 600 nm et 900 nm, se rapporte aux transitions électroniques S_{22} des nanotubes semiconducteurs et est à la base de la création du réservoir d'excitons dans les nanotubes de carbone. La dernière zone correspond aux pics d'absorption de la transition S_{11} des nanotubes semiconducteurs. En réalité, il est difficile de décorréler la contribution des nanotubes métalliques de celles des semiconducteurs dans le spectre d'absorption. Néanmoins, il est probable que les nanotubes métalliques contribuent en partie au fond d'absorption visible dans les spectres des nanotubes [Naumov].

Il est important de noter que lorsqu'il y a une distribution très large de nanotubes en terme de chiralité dans un échantillon, une bande dans le spectre d'absorption peut être constituée d'une superposition de pics d'absorption de plusieurs chiralités.

La structuration en pics fins est la signature d'une bonne mise en suspension (i.e. d'une individualisation) des nanotubes. Au contraire, des bandes larges et moins structurées traduisent que les nanotubes sont majoritairement agrégés en fagots [Reich].

La spectroscopie d'absorption des nanotubes de carbone est devenue un outil important dans la caractérisation d'un échantillon. Le nombre et la position des pics d'absorption permettent de déterminer dans la plupart des cas la population (n, m) présente dans un échantillon donné. L'intensité relative des pics donne des informations sur les concentrations relatives des espèces (n, m) .

2.2.1 SECTION EFFICACE D'ABSORPTION DES NANOTUBES

La section efficace décrit la probabilité d'une interaction entre particules. La section efficace d'absorption d'un matériau est donc la probabilité qu'il se produise un processus d'absorption d'un photon par un atome. Plusieurs groupes ont mesuré la section efficace des nanotubes dans un environnement donné. Berciaud *et al.* ont évalué la section efficace d'absorption σ_{22} de la transition S_{22} du nanotube individuel (6,5) en utilisant l'expression définissant le taux de photons absorbés par une portion L de nanotube :

$$N_{abs}(L) = \sigma_{22} L \frac{I}{\hbar\omega}$$

où I est l'intensité du laser ayant une polarisation parallèle à l'axe du nanotube ($\hbar\omega \approx 2,19$ eV). La valeur de la section efficace d'absorption de la transition S_{22} du (6,5) a été évaluée à environ 10^{-17} cm² par atome de carbone sur des CNTs de longueur supérieure à 1 μ m [Berciaud 2008]. Cette valeur est un ordre de grandeur au dessus des résultats issus de mesures faites sur un ensemble de nanotubes et du même ordre que des mesures faites sur des nanoparticules d'or ou d'argent [Cognet].

2.2.2 PHOTOTHERMIE DES NANOTUBES DE CARBONE

L'absorption d'une onde lumineuse incidente par un nano-objet qui est sujet principalement à des processus de relaxation non-radiatifs donne lieu à une élévation de sa température. Ceci entraîne une modification de l'indice de réfraction n au voisinage de la région chauffée. Cet effet photothermique a permis de mesurer de très faibles absorptions dans des solides ou des liquides mais aussi à la surface d'échantillons non transparents et dans des échantillons biologiques dans les années 1970-1980 [Boccara, Hu 1973, Stone].

Comme indiqué un peu plus haut, la section efficace d'absorption de CNTs individualisés est de l'ordre de 10^{-17} cm² par atome de carbone, ce qui met en évidence la forte absorbance de ces nano-objets (**Figure I-9**). Cette section efficace a été déterminée par imagerie photothermique hétérodyne par le groupe Nanophotonique de l'université Bordeaux 1 [Berciaud 2007]. La sensibilité de la méthode PHI est excellente et permet de détecter de nombreux

objets absorbants autres que les CNTs tels que les nanoparticules d'or et d'argent [Berciaud 2005] et les nanocristaux semiconducteurs [Berciaud 2004] avec d'excellents rapports signal sur bruit [Cognet]. Il est possible de réaliser la spectroscopie d'absorption des CNTs par l'utilisation de la combinaison de deux lasers : un faisceau laser excitateur chauffant modulé temporellement proche de la résonance d'absorption des CNTs et un faisceau laser peu absorbé servant de sonde. Lorsque les faisceaux sont focalisés au voisinage d'un nano-objet absorbant et se superposent, le profil d'indice de réfraction dû à l'absorption partielle du faisceau excitateur diffuse en partie le faisceau sonde. L'avantage de la méthode PHI est qu'elle permet la détection des CNTs semiconducteurs mais également métalliques, contrairement à la photoluminescence [Berciaud 2007]. Il est donc possible d'imager des nanotubes qui sont peu ou pas photoluminescents.

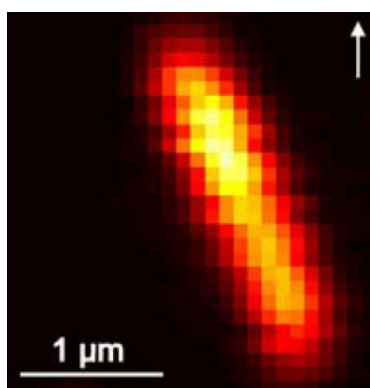


Figure I-9 : Image photothermique d'un nanotube de carbone individuel long. [Berciaud 2008]

3 SCISSION DES NANOTUBES DE CARBONE

Nous décrivons ici les principales méthodes physiques, puis chimiques (en particulier l'oxydation) permettant de réduire la longueur des nanotubes de carbone de façon significative.

3.1 METHODES PHYSIQUES

3.1.1 BROYAGE A BILLES

Le broyage à billes (« ball milling ») est un procédé permettant de broyer des solides et de les réduire à l'état de poudre fine. Il est utilisé dans des domaines tels que la pyrotechnie, la peinture, la céramique, la chimie, la cosmétique, et a pour but d'obtenir des dispersions uniformes de particules oxydées (Al_2O_3 , Y_2O_3 ...).

Le broyeur à billes est constitué d'un tambour horizontal mis en rotation par un moteur. Le tambour est partiellement rempli par le solide (ou poudre) à broyer, puis les billes nécessaires au broyage sont ajoutées. Une fois la rotation lancée, les forces d'impact et de friction des billes sur la poudre entraînent la diminution en taille de celle-ci (**Figure I-10**). Les broyeurs à billes de haute qualité permettent d'obtenir des particules d'une taille de 5 nm, augmentant ainsi la surface spécifique et donc potentiellement la réactivité des particules.

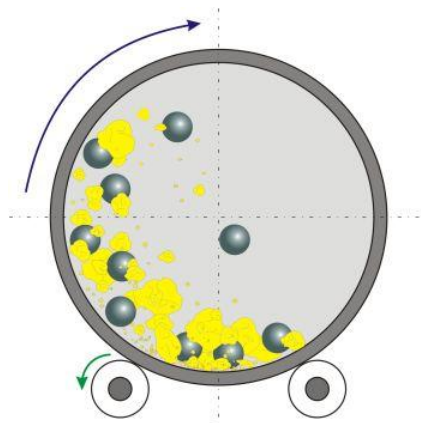


Figure I-10 : Représentation schématique simplifiée (plan horizontal) du processus de broyage par billes.

De nombreux facteurs ont un impact sur la taille des particules à la fin du broyage :

- Le type d'appareil
- La composition des billes (fer, chrome, nickel, oxide de zirconium, agate, carbide de tungstène...) et leur taille
- Le rapport de masse billes/poudre
- L'espace libre dans la chambre de broyage
- L'atmosphère dans la chambre de broyage
- La vitesse
- Le temps

La vitesse et le temps sont certainement les paramètres les plus importants du broyage par billes. Plus la vitesse de broyage est importante, plus l'intensité du broyage est grande, et la température de la chambre de broyage peut alors atteindre des valeurs importantes [Suryanarayana]. Il est à noter qu'au dessus d'une vitesse critique, les billes se collent sur les parois du tambour à cause de la force centrifuge et n'exercent plus aucune force d'impact sur la poudre. Le temps d'expérience permet également de réduire significativement la taille des particules, bien que de longs temps d'expérimentation occasionnent une forte aggrégation voire dégradation des échantillons [Piérard 2004].

A partir des travaux de Li *et al.* portant sur la transformation de nanotubes de carbone en nanoparticules oignons [Li], Pierard *et al.* ont montré en 2001, à partir de MWCNTs mesurant 50 μm , l'obtention de CNTs d'une longueur inférieure à 1 μm par le procédé de ball-milling [Pierard 2001]. Ils n'observent aucune autre forme carbonée que les nanotubes de carbone, même après 120 h de procédé. Ces auteurs proposent que la scission des nanotubes est facilitée par la présence de défauts structuraux au niveau des courbures qui peuvent céder par compression. La longueur finale des nanotubes dépend des paramètres expérimentaux, alors que la résistance des nanotubes à la scission dépend de leur diamètre (les nanotubes de plus gros diamètre sont plus résistants que ceux présentant un petit diamètre).

Ces mêmes auteurs montrent en 2004 l'impact du broyage à billes sur des SWCNTs d'une longueur de 10 μm [Pierard 2004]. La diminution des longueurs jusqu'à 100 nm des nanotubes est observée, mais les SWCNTs ne résistent pas à de très longs temps de broyage. Le temps optimal de traitement, pour conserver leur structure tubulaire et maximiser leur surface spécifique, est de 2 h. Au-delà apparaît une destruction progressive des SWCNTs. Après 50h, la destruction de la structure tubulaire est complète et les auteurs observent d'autres formes carbonées (carbone amorphe).

Le procédé précédemment cité est intéressant pour obtenir des nanotubes de carbone raccourcis en grandes quantités. Malheureusement, il s'avère que cette méthode ne permet pas d'obtenir des CNTs d'une longueur inférieure à 100 nm sans occasionner de profondes dégradations structurelles.

3.1.2 SONICATION

Les ultrasons sont couramment utilisés pour disperser des particules colloïdales. De manière générale, les ultrasons sont reconnus comme une des méthodes les plus efficaces pour générer de hautes contraintes mécaniques dans un milieu liquide [Mason, Suslick]. Ils permettent notamment de produire des contraintes de cisaillement susceptibles d'étirer, de dégrader ou même casser des macromolécules. Ils sont particulièrement efficaces pour disperser les nanotubes et sont connus aussi pour les couper [Badaire, Hennrich].

Lorsqu'un liquide est soumis à des ultrasons, les ondes sonores compressent et étirent localement le liquide (**Figure I-11**).

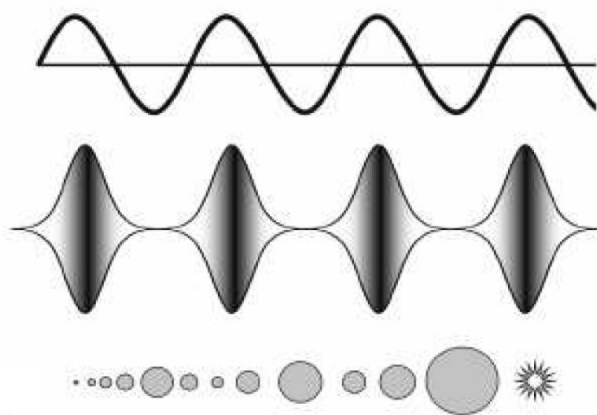


Figure I-11 : Représentation schématique de la création, de la croissance et de l'implosion des bulles de cavitation.

Ces cycles de compression et d'étirement éloignent les molécules jusqu'à ce que la distance entre les molécules devienne trop grande et « casse » le liquide. On parle alors de « pression négative », c'est-à-dire que la pression locale devient inférieure à la pression de vapeur liquide. Il y a alors un changement de phase de la phase liquide à la phase gazeuse. Ces bulles de gaz qui apparaissent sont des bulles de cavitation. Ce phénomène de cavitation acoustique induit par les ultrasons entraîne la scission des nanotubes.

La cavitation acoustique dépend essentiellement des propriétés physico-chimiques du solvant, notamment de sa viscosité, de sa température et de sa pression. La cavitation acoustique peut être divisée en trois étapes : la création, la croissance et l'implosion de bulles microscopiques de gaz. Une fois les bulles de cavitation créées, leur taille augmente sur quelques dizaines de microsecondes par des cycles de compression et de raréfaction (**Figure I-11**). On parle de « diffusion rectifiée » [Crum, Lee].

Quand la taille des bulles atteint une taille critique de résonance, elles deviennent instables et s'effondrent. L'implosion des bulles s'accompagne de forts cisaillements dans le liquide environnant pouvant induire par exemple la coupure de chaînes polymères [Nguyen, Odell] ou de nanotubes [Hennrich]. Hennrich *et al.* ont décrit la scission de SWCNTs par un modèle continu analogue à celui décrivant la coupure des chaînes polymères [Hennrich]. Ce modèle prévoit une scission des nanotubes de carbone étirés sous l'effet d'une force de friction induite par l'implosion de bulles de cavitation à leur voisinage (**Figure I-12**).

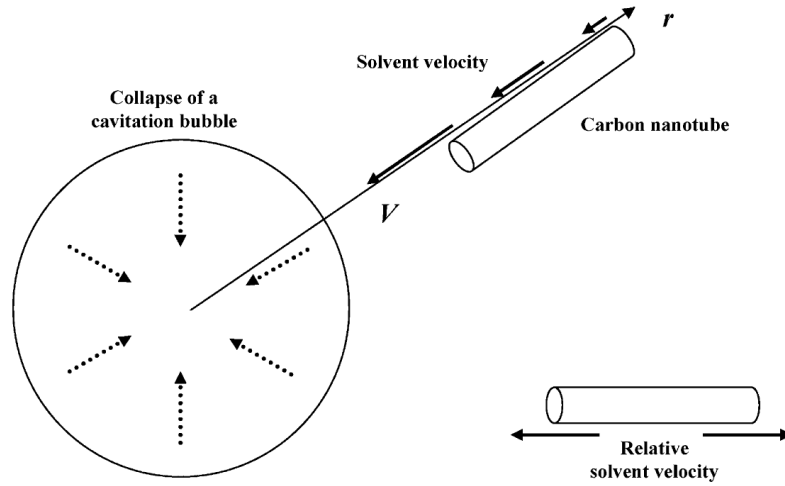


Figure I-12 : Représentation schématique de l'étirement et de la scission d'un nanotube de carbone au voisinage d'une bulle de cavitation. [Lucas 2009a]

La scission des nanotubes de carbone serait alors gouvernée par la force de friction F s'exerçant sur le nanotube qui est maximale au centre de celui-ci :

$$F = \frac{1}{2} \pi \mu \left(\frac{d\varepsilon}{dt} \right) L^2$$

où μ est la viscosité du solvant, $\frac{d\varepsilon}{dt}$ le taux de cisaillement élongationnel et L la longueur du nanotube de carbone.

Les nanotubes sont coupés jusqu'à une longueur critique L_c . En effet, selon Hennrich *et al.*, la scission des nanotubes de carbone saturerait lorsque le taux de cisaillement élongationnel égale la contrainte à la rupture σ des nanotubes de carbone en suspension :

$$\sigma = 2\mu \left(\frac{d\varepsilon}{dt} \right) L_c^2$$

Les auteurs ont vérifié expérimentalement la saturation de taille de SWCNTs, dispersés dans l'eau avec du cholate de sodium et soumis aux ultrasons ($f = 20$ kHz, $P_{US} = 20$ W). Par des mesures de microscopie à force atomique (AFM), ils montrent une longueur critique L_c d'environ 140 nm.

L'application d'ultrasons se révèle être une méthode appropriée pour casser les agrégats de nanotubes et/ou individualiser les SWCNTs initialement en faisceaux [O'Connell 2002]. Néanmoins, cela s'accompagne d'une dégradation des nanotubes de carbone. Ces dégradations sous l'effet des ultrasons ont déjà été observées dès 1996 par microscopie électronique à transmission (MET) et spectroscopie Raman [Lu 1996]. En 2003, Islam *et al.*

rapportent la mise en suspension d'une grande quantité de SWCNTs HiPCO (20 mg/mL) par divers tensioactifs à l'aide d'un bain à ultrasons ($f = 55$ kHz, $P_{US} = 12$ W pendant ~ 24 h). Les auteurs observent une forte réduction des diamètres moyens conduisant à l'obtention de faisceaux de 1 à 2 nm au final, mettant en évidence l'individualisation des SWCNTs par les ultrasons [Islam]. De plus, ils comparent l'efficacité d'utilisation d'un bain ou d'une sonde pour délivrer les ultrasons au milieu. Les mesures de longueurs démontrent une plus forte fragmentation des SWCNTs d'un facteur deux lors de l'utilisation d'une sonde à ultrasons au lieu d'un bain.

Le meilleur ajustement observé est une fonction dépendant du temps d'application des ultrasons par une loi de puissance en $T_{US}^{-0,49}$ [Hennrich]. Ces résultats sont en accord avec un modèle simple de scission des nanotubes de carbone ou de polymères selon une cinétique du premier ordre. La cinétique de coupure aux temps courts est théoriquement proportionnelle à $T_{US}^{-\frac{1}{2}}$. Mais aux longs temps d'application des ultrasons, il est attendu une saturation des longueurs lorsque les effets du cisaillement sont insuffisants pour casser les liaisons.

Cette saturation des longueurs ne semble pas atteinte pour des SWCNTs pour des temps longs, et ce malgré l'apport d'une forte énergie acoustique au système [Lucas 2009b]. Il faudrait selon ces auteurs fournir des énergies acoustiques nettement plus grandes. En considérant un SWCNT isolé de 1 nm de diamètre et de contrainte à la rupture σ de 30 GPa, la longueur de saturation calculée est de l'ordre de $L_C = 14$ nm et il nécessiterait l'apport de 10^{10} kJ au système pour y arriver expérimentalement, soit 3171 ans dans leurs conditions d'expériences. Cette valeur $L_C = 14$ nm est plus faible que celles rapportées par d'autres groupes dans la littérature [Badaire, Hennrich, Hilding] mais notons que Sun *et al.* montrent l'obtention de SWCNTs ultracourts enrobés de PL-PEG d'une longueur moyenne de 7,5 nm [Sun 2008a].

Lucas *et al.* expliquent cette déviation par rapport à la loi communément admise en $T_{US}^{-\frac{1}{2}}$ car pour de faibles énergies acoustiques, les nanotubes sont encore longs et la probabilité de contact entre un nanotube de carbone et une bulle de cavitation est grande. En revanche, pour de hautes énergies acoustiques, les nanotubes sont relativement courts et le paramètre de probabilité de contact d'une bulle de cavitation et d'un nanotube de carbone diminue fortement.

Pagani *et al.* expliquent la cinétique de rupture par un mécanisme de scission différent des mécanismes proposés jusqu'à maintenant. Les auteurs montrent qu'un nanotube court et un nanotube long ont des taux de scission différents [Pagani]. Les CNTs s'alignent tangentielllement à la surface des bulles de cavitation en croissance. Cependant lors de

l'effondrement des bulles de cavitation les CNTs les plus courts s'orientent radialement tandis que les plus longs restent pour la plupart alignés tangentiellement (**Figure I-13**).

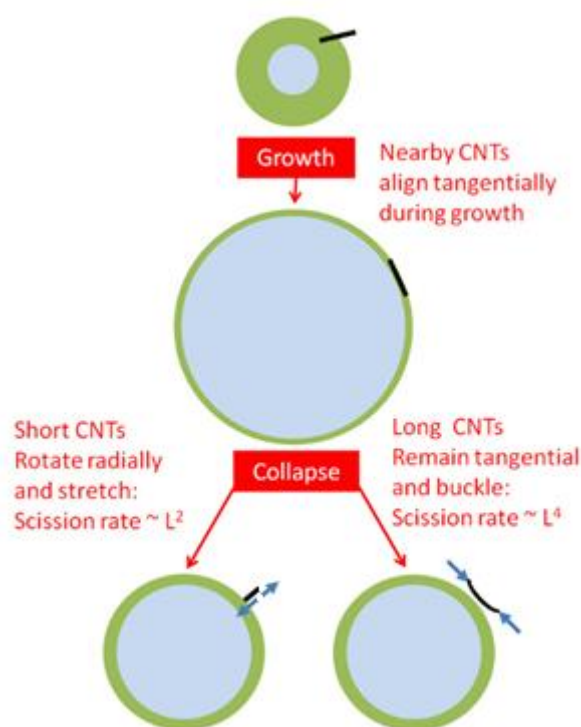


Figure I-13 : Mécanisme de scission des nanotubes selon leur longueur. La nucléation des bulles de cavitation est représentée en vert, la bulle de cavitation est représentée en bleu. [Pagani]

Ainsi, les nanotubes courts ont des taux de scission variant en L^2 contre L^4 pour les tubes les plus longs. Ceci explique une forte diminution des cinétiques de coupure des nanotubes de carbone dans le temps.

3.2 METHODES CHIMIQUES : OXYDATION

De nombreux procédés pour oxyder les nanotubes existent. Nous présentons principalement dans cette partie bibliographique les travaux conduisant à une réduction significative de la longueur des nanotubes de carbone, mais également l'ouverture de ceux-ci selon leur axe longitudinal par « unzipping ».

3.2.1 OZONOLYSE

L'ozone (O_3) est un puissant électrophile qui attaque et ouvre les liaisons C=C dans de nombreux composés organiques selon le mécanisme de Criegee [Criegee]. L'ozone subit une réaction de cycloaddition dipolaire 1-3 avec une insaturation, amenant à la formation d'un ozonide qui se décompose rapidement en présence d'eau en fonctions carboxylique, cétone, lactone, alcool et peroxyde (**Figure I-14**).

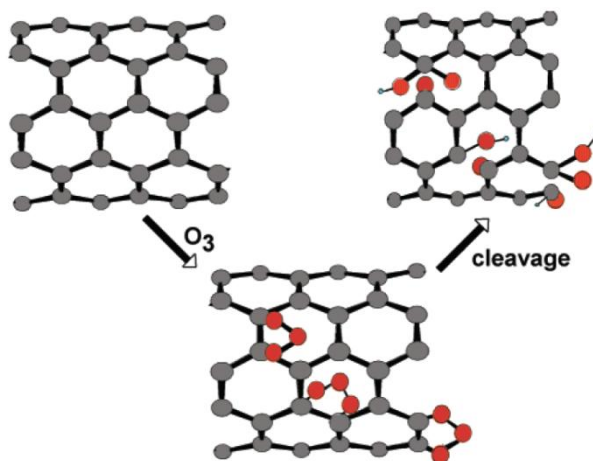


Figure I-14: Représentation schématique du mécanisme de Criegee pour l'ozonolyse de CNTs. Les atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène sont représentés en gris, rouge et bleu respectivement. [Banerjee]

Outre la création de ces nombreuses fonctions oxygénées, ce puissant agent oxydant permet également de réduire la longueur des CNTs. Des études ont montré que l'ozone agissait au niveau des extrémités des CNTs [Mawhinney], mais également au niveau de la paroi des CNTs [Banerjee, Chen 2006]. En effet, la courbure géométriquement contrainte des parois des CNTs et la forte réactivité de l'ozone vis-à-vis des liaisons C=C permet une ouverture facile des cycles carbonés. L'équipe de Smalley rapporte l'utilisation de l'ozone et de ses effets sur le raccourcissement des CNTs [Chen 2006]. Elle montre, à l'aide de mesures AFM, qu'une ozonolyse de 3h entraîne une augmentation des tubes d'une taille inférieure à 60 nm de 164%, pour une perte de masse de 20%.

3.2.2 TRAITEMENTS ACIDES

De nombreuses méthodes d'oxydation à l'aide d'acides ont été développées dans l'optique de réduire la longueur des nanotubes de carbone. La scission peut être longitudinale ou transversale selon les cas. L'oxydation à l'aide d'acides entraîne également une augmentation du nombre de fonctions carboxyliques à la surface des nanotubes et donc de leur solubilité dans des solvants polaires.

- ACIDE SULFURIQUE ET PERMANGANATE DE POTASSIUM

L'équipe de Tour rapporte en 2009 la scission selon leur axe longitudinal de MWCNTs par l'utilisation conjointe d'acide sulfurique et de permanganate de potassium [Kosynkin]. Ceci amène à la formation de nanorubans de carbone, semblable à des feuillets de graphène oxydés (GO) (**Figure I-15**).

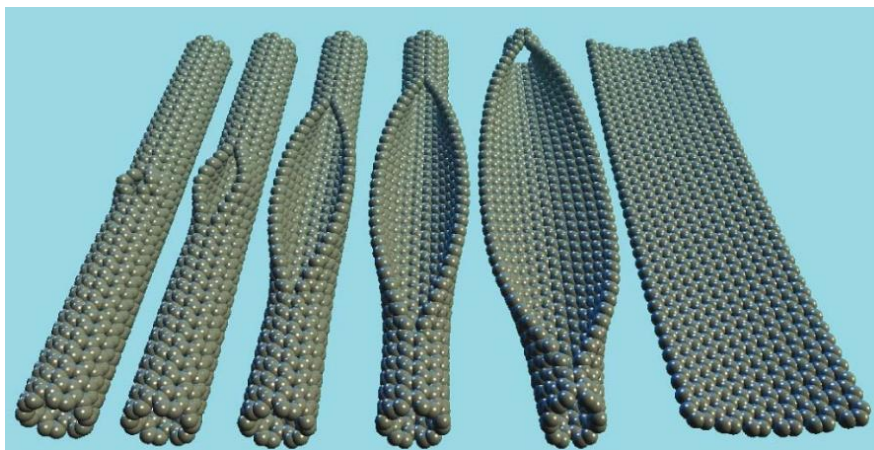


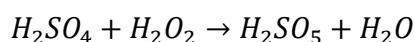
Figure I-15 : Représentation schématique du processus de scission longitudinale de CNTs (« unzipping ») avec l'obtention de nanorubans. [Kosynkin]

Le mécanisme d'ouverture proposé par ces auteurs est l'attaque du permanganate sur les nanotubes avec formation d'intermédiaires esters de manganate conduisant à la formation de fonctions cétones. L'introduction de ces fonctions amène des contraintes au niveau des liaisons C=C adjacentes, facilitant une nouvelle attaque par du permanganate. Après 2h de réaction avec un mélange d'acide sulfurique concentré et de permanganate de potassium à 500% en masse, ils obtiennent des nanorubans oxydés d'une centaine de nm de large et de plusieurs μm de long, avec un rendement de quasiment 100%.

Les traitements oxydants présentés par la suite concernent la scission transversale des nanotubes de carbone.

- SOLUTION PIRANHA

La solution piranha est un mélange d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène, typiquement dans des proportions vol/vol : 4/1 (H_2SO_4 à 96%, H_2O_2 à 30%), conduisant à la formation d'un puissant oxydant H_2SO_5 (acide de Caro ou acide peroxymonosulfurique) :



Ziegler *et al.* utilisent tout d'abord le procédé de fluoration avant d'appliquer le mélange piranha [Ziegler]. Le fluor provoque l'hybridation sp^3 des atomes de carbone, créant une distorsion du réseau de carbone du CNT. La fluoration des CNTs provoque ainsi la création de lacunes dans la structure tubulaire pouvant être exploitées par la suite (**Figure I-16**). Les CNTs sont ensuite défluorés par l'utilisation d'hydrazine.

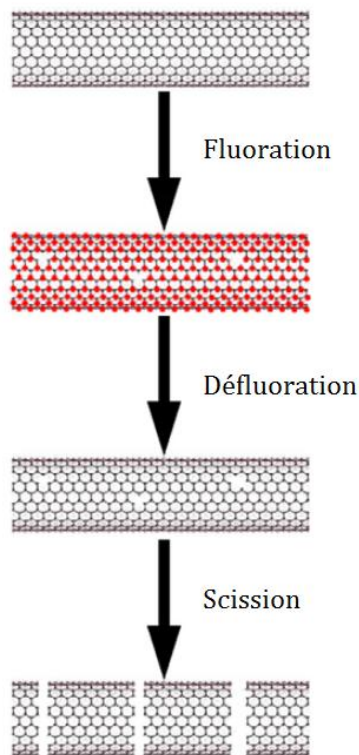


Figure I-16 : Représentation schématique du mécanisme de scission des CNTs par fluoration/défluoration puis rupture des liaisons C-C par l'utilisation d'une solution piranha. [Ziegler]

Après 9h de réaction avec une solution piranha à température ambiante puis mesure par AFM, 30% des CNTs (430nm de longueur initiale) ont une longueur inférieure à 100 nm (pour 250 nm de long en moyenne). De plus, la perte de masse est de 10% seulement [Ziegler]. Cette dernière peut aller jusqu'à environ 50% à des températures plus élevées (70°C), auquel cas 50% des CNTs sont inférieurs à 100 nm (pour 150 nm de long en moyenne). Quelle que soit la température, le raccourcissement des extrémités des CNTs existe toujours. La comparaison des taux de raccourcissement (1 à 5 nm par heure à 25°C contre 15 à 20 nm par heure à 70°C) prouve qu'à température ambiante, les solutions piranha agissent principalement au niveau des lacunes.

Ces mêmes auteurs utilisent également l'association de l'acide sulfurique avec du persulfate d'ammonium pour couper les CNTs. Les résultats obtenus de cette manière sont sensiblement équivalents à ceux obtenus à l'aide de solutions piranha.

- ACIDE NITRIQUE ET OLEUM

Récemment, Price *et al.* proposent l'utilisation du mélange d'acide nitrique et d'oléum (H_2SO_4 et SO_3 en excès) pour oxyder agressivement les CNTs [Price]. Les SWCNTs traités par cette méthode sont fortement oxydés à une température de 65°C, les images d'AFM montrent des longueurs de 30 nm en moyenne pour une perte de masse de 2% sous forme

de fragments carbonés carboxylés (CCFs, pour Carboxylated Carbonaceous Fragments en anglais).

- ACIDE SULFURIQUE ET/OU ACIDE NITRIQUE

Développée par l'équipe de Smalley, cette méthode consiste à traiter les nanotubes de carbone par un mélange d'acides nitrique et sulfurique pour augmenter la quantité de défauts oxygénés à la surface des CNTs [Liu 1998]. Après ce traitement oxydant, les nanotubes présentent de nombreuses fonctions oxygénées principalement carboxylique mais aussi phénol et cétone [Hamon 2001]. Ces fonctions impliquent la présence de lacunes plus ou moins importantes à la surface des nanotubes créés. Au final, une fonction carboxylique peut être présente tous les 15 à 25 atomes de carbone. Ces fonctions sont retrouvés principalement aux extrémités des CNTs qui sont désormais ouvertes [Chen 2001a, Hu 2001]. La présence de fonctions carboxyliques à la surface des nanotubes permet leur dispersion dans de nombreux solvants polaires, tel que l'eau, évitant l'utilisation de tensioactifs [Worsley].

Liu *et al.* constatent que ce traitement oxydant à l'aide du mélange d'acides raccourcit les nanotubes au niveau des défauts structuraux et au niveau des extrémités. Des mesures sur des images AFM montrent que les SWCNTs avant oxydation présentent une longueur moyenne de 280 nm, tandis que les tubes après traitement oxydant ont une longueur moyenne de 150 nm, avec 27% de CNTs d'une taille inférieure à 100 nm [Liu 1998]. La perte de masse lors de cette réaction pouvant être conséquente, il est possible, pour limiter les dommages structuraux infligés aux nanotubes, de diminuer la concentration en agents oxydants et le temps de réaction. Il est également possible de n'utiliser que l'acide nitrique. Une oxydation à l'acide nitrique en concentration modérée entraîne alors des densités de greffage en groupements oxygénés plus faibles [Marques, Tchoul]. Tchoul *et al.* montrent qu'une oxydation au reflux par l'acide nitrique concentré (2,6 M) entraîne une réduction de la longueur de CNTs HiPCO de 950 nm à 570 nm en 4h, et jusqu'à 400 nm en 12h [Tchoul].

Il faut donc trouver le juste équilibre entre introduction de fonctions carboxyliques et intégrité des CNTs. C'est l'acide nitrique couplé à la sonication que nous avons utilisé afin de raccourcir les nanotubes de carbone car les expériences sont relativement aisées et contrôlables.

4 SEPARATION DES NANOTUBES DE CARBONE

Il n'existe pas un seul type de nanotubes dans un échantillon brut, comme montré dans la **partie 2** de ce **chapitre I**, mais un large ensemble de familles de nanotubes de carbone, chaque famille ayant un diamètre et une chiralité différents. Ces différences structurales génèrent d'importantes variations des propriétés d'un type de nanotubes à l'autre.

Plusieurs voies ont été explorées afin de séparer les nanotubes selon leur caractère métallique ou semiconducteur [Hu 2003, Strano, Yang 2006a, Zhang], leur chiralité [Gosh, Ju, Tu], leur diamètre [Arnold 2006, Zheng], leur hélicité [Gosh, Green, Peng] et leur longueur [Chen 2002, Chun, Duesberg, Fagan, Heller, Kuang, Sun 2008a] afin d'obtenir des solutions monodisperses d'un type de nanotube. Les méthodes permettant un tri des nanotubes selon leur longueur sont :

- La chromatographie par exclusion stérique [Duesberg, Fagan] et le « Field-Flow Fractionation » [Chen 2002, Chun]
- L'électrophorèse [Heller]
- L'ultracentrifugation en gradient de densité [Kuang, Sun 2008a]

La chromatographie par exclusion stérique et l'électrophorèse sont des méthodes non préparatives, ne permettant pas d'obtenir de grandes quantités de nanotubes après tri. Le « Field-Flow Fractionation » permet de caractériser assez finement la taille de nanotubes mais les dispersions analysées doivent être relativement monodisperses en longueur.

Ainsi, nous présentons ici l'ultracentrifugation en gradient de densité, procédé utilisé au cours de mes travaux de thèse.

4.1 ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE

La séparation des nanotubes par ultracentrifugation est à ce jour une des méthodes les plus performantes en termes de sélectivité. Elle permet de séparer les nanotubes selon leur chiralité ou selon leur longueur en fonction des phénomènes cinétiques mis en jeu.

4.1.1 SELON LE DIAMETRE, LA METALLICITE OU LA CHIRALITE

L'ultracentrifugation à gradient de densité (DGU, pour Density Gradient Ultracentrifugation en anglais) est très performante et polyvalente puisqu'elle permet de séparer les SWCNTs selon leurs propriétés électriques et structurales telles que le diamètre, le caractère métallique ou semiconducteur et la chiralité (n, m). Elle est basée sur la densité volumique des nanotubes de carbone dans un solvant. Cette valeur est légèrement différente pour chaque espèce de nanotubes. La densité du milieu et son gradient doivent être optimisés pour séparer les CNTs à différentes positions d'équilibre.

En 2005, Arnold et Hersam rapportent le premier exemple de l'utilisation de la DGU pour séparer des SWCNTs entourés d'ADN selon leur diamètre [Arnold 2005]. Ils ont également montré par la suite qu'il était possible d'adapter les densités volumiques entre chiralités en les enrobant dans divers tensioactifs comme le dodécylsulfate de sodium (SDS), le sodium dodécylsulfobenzène de sodium (SDBS) ou le cholate de sodium (SC) (**Figure I-17a**) [Arnold 2006]. En ultracentrifugeant ces nanotubes dans un milieu liquide à gradient de densité de iodixanol, il est possible de séparer les nanotubes selon leur diamètre ou leur nature électronique. La **Figure I-17b**) présente la photographie d'une solution de nanotubes CoMoCAT enrobés dans du SC après une ultracentrifugation à 150000 g. On observe une série de zones de couleurs différentes qui sont dues à l'absorption des nanotubes de carbone semiconducteurs de chiralités différentes (gaps d'absorption différents). Les spectres d'absorption correspondant à chaque zone montrent une évolution de l'intensité relative des pics d'absorption de nanotubes ayant trois diamètres différents et soulignés par les bandes de couleurs (**Figure I-17c**). On constate qu'en haut du culot se trouvent seulement des nanotubes de petits diamètres puisqu'il n'y a qu'un seul pic d'absorption à 940 nm. Par contre deux autres pics à des longueurs d'onde supérieures (diamètre plus grand) apparaissent lorsqu'on descend dans le culot. Ces spectres sont la preuve qu'il est possible d'extraire des nanotubes en fonction de leur diamètre. En jouant sur le tensioactif, il est également possible de séparer les nanotubes semiconducteurs et métalliques avec un degré de pureté avoisinant les 95% [Arnold 2006].

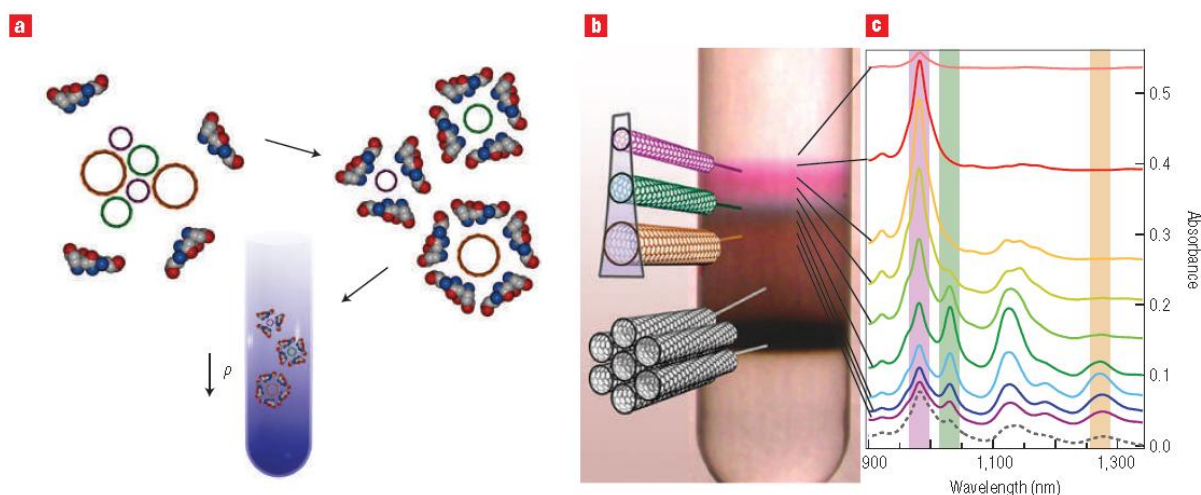


Figure I-17 : a) Mécanisme de centrifugation à gradient de densité. Les nanotubes sont dispersés par un tensioactif dans un mélange iodixanol/eau dont la densité ρ varie en fonction de la position dans le tube. Lors de l'ultracentrifugation, un nanotube de gros diamètre sera entraîné plus bas qu'un nanotube de faible diamètre. b) Photographie d'un tube à centrifugation après ultracentrifugation d'un mélange de nanotubes CoMoCAT dispersés dans du SC. Les différentes couleurs sont caractéristiques d'une séparation par chiralité. c) Spectres d'absorption des nanotubes prélevés en différents du tube de centrifugation. [Arnold 2006]

Gosh *et al.* ont par la suite affiné la DGU pour séparer plusieurs chiralités (n, m), mais également des énantiomères, de SWCNTs de type HiPCO dispersés dans du cholate de sodium (pour la séparation chirale) ou dans un mélange de deux tensioactifs (pour la séparation énantiomérique) [Gosh]. Ce tri est relativement long (12h) mais permet d'obtenir la séparation de 10 chiralités et de 7 énantiomères par ce procédé.

4.1.2 SELON LA LONGUEUR

La DGU permet également de sélectionner les nanotubes selon leur longueur. Contrairement au cas précédent, ce tri implique des effets cinétiques. Sun *et al.* ont repris le principe de séparation à l'aide du gradient de iodixanol, mais en adaptant la densité [Sun 2008a]. En effet, contrairement au gradient isopycnique des équipes de Hersam et Weisman [Arnold 2005, Arnold 2006, Gosh], les auteurs proposent l'utilisation de couches de iodixanol de densité inférieure à celle des nanotubes individualisés dans un polymère phospholipidique PL-PEG. Ainsi, aucun nanotube n'est arrêté par une densité de milieu trop grande et le temps de centrifugation est le seul paramètre influant sur la séparation des nanotubes par leur longueur.

Selon Kuang *et al.*, la relation entre la vitesse d'un bâtonnet et son rapport d'aspect s'accorde plus avec un modèle linéaire que logarithmique [Kuang]. La sédimentation met en jeu les forces suivantes :

- La force centrifuge $F_c = \omega^2 r \rho_{NT} V$
- La force de flottabilité $F_b = - \omega^2 r \rho_m V$
- La force fluctuante brownienne F_f
- La force de traînée visqueuse $F_d = - \zeta v$

Avec ρ_{NT} et ρ_m les densités du nanotube et du milieu respectivement, V le volume du tube d'ultracentrifugation, ω la vitesse angulaire, r la distance du centre du tube à la particule, v la vitesse de sédimentation et ζ le coefficient de friction.

La vitesse de sédimentation limite est donnée par l'égalisation de ces forces selon l'équation de Langevin d'une particule subissant le mouvement brownien sous l'influence d'une force extérieure :

$$F = F_d + F_b + F_c + F_f = 0$$

Ce qui implique :

$$\omega^2 r V (\rho_{NT} - \rho_m) - \zeta v = 0$$

Le coefficient de sédimentation S (ou coefficient de Svedberg) permet d'exprimer la vitesse de sédimentation normalisée par l'accélération angulaire appliquée :

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{(\rho_{NT} - \rho_m)V}{\zeta}$$

Ce coefficient de Svedberg pour un nanotube de rayon a et de longueur L peut s'écrire :

$$S = \frac{(\rho_{NT} - \rho_m)V}{\zeta} = \frac{(\rho_{NT} - \rho_m)(\pi a^2 L)}{\zeta}$$

Il est une mesure du taux de sédimentation et dépend du rapport de la masse effective et du facteur de friction ζ [Svedberg]. Le coefficient de friction ζ dépend de la longueur des nanotubes de façon non linéaire avec des corrections complexes [Batchelor]. Compte tenu de ces différents coefficients de frictions, le tri des nanotubes se fait selon leur longueur.

L'expression du coefficient de sédimentation indique que la vitesse de sédimentation dépend à la fois de la longueur des CNTs et de la densité du milieu (ρ_m). Les nanotubes les plus longs sont retrouvés en bas du tube de centrifugation tandis que les plus courts sont localisés en haut du tube de centrifugation à la fin du processus d'ultracentrifugation (**Figure I-18**). La fonction du gradient de densité est de permettre une séparation des nanotubes avec une meilleure résolution spatiale.

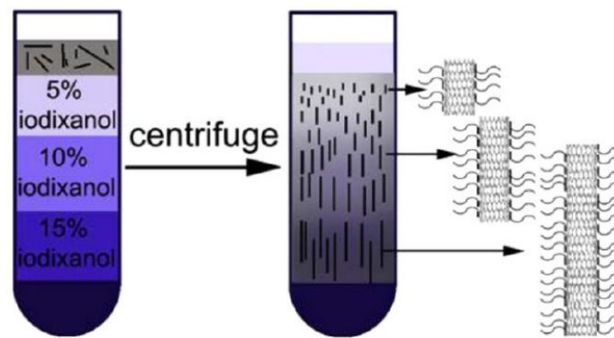


Figure I-18 : Représentation schématique du mécanisme de séparation des nanotubes par leur longueur par DGU. [Kuang]

De cette manière, les tubes les plus courts obtenus après 3h de ce procédé ont une longueur inférieure à 10 nm pour les fractions les plus hautes [Kuang].

C'est la méthode de séparation des nanotubes de carbone que j'ai utilisée au cours de mes travaux de thèse avec quelques adaptations. Elle est préparative, contrôlable et simple à mettre en place.

5 FONCTIONNALISATION DES NANOTUBES DE CARBONE

Les principales approches pour fonctionnaliser les CNTs peuvent être classées en deux grands ensembles (**Figure I-19**) :

- La fonctionnalisation non-covalente
- La fonctionnalisation covalente

Elles permettent la solubilisation ou dispersion des nanotubes de carbone ainsi que leur biofonctionnalisation pour une utilisation dans des applications biomédicales (substrats pour la régénération de tissus [Saito 2009], vectorisation [Lu 2009, Ménard-Moyon], imagerie médicale [Hong]).

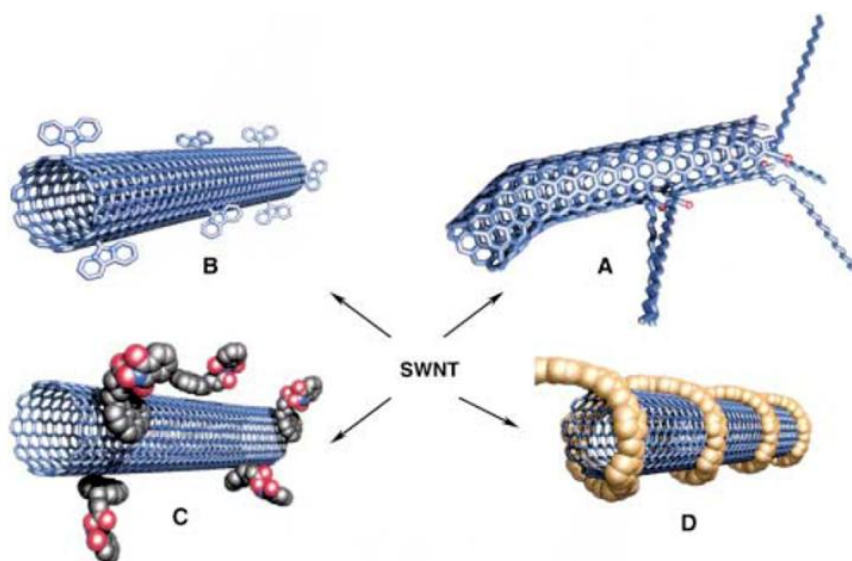


Figure I-19 : Représentation schématique des différentes stratégies de fonctionnalisation développées pour les nanotubes (mono-paroi) : covalente via les défauts (A) et via des réactions chimiques (B) ; non covalente via des tensioactifs (C), ou des polymères (D). [Hirsch]

5.1 FONCTIONNALISATION NON-COVALENTE

La fonctionnalisation non-covalente implique uniquement une liaison physique entre les nanotubes et le groupement fonctionnel. L'avantage de la fonctionnalisation non covalente est de rendre les nanotubes dispersables dans un solvant aqueux ou organique sans modifier la structure du nanotube. L'absence de modification chimique de la structure carbonée préserve la structure électronique des nanotubes. Cependant ces dispersions sont métastables et les nanotubes sédimentent au bout de quelques minutes à quelques années. Pour réaliser cette fonctionnalisation, il faut également fournir au système l'énergie suffisante pour défaire les agrégats et placer le groupement fonctionnel à la surface des nanotubes. Cette énergie, apportée le plus souvent sous forme d'ultrasons, endommage les CNTs, les raccourcit, ce qui altère leurs propriétés [Lucas 2009a].

La fonctionnalisation non covalente repose sur les forces de van der Waals entre les nanotubes et les molécules. Des candidats intéressants pour la fonctionnalisation non-covalente sont par exemple des molécules possédant de longues chaînes carbonées : des tensioactifs [Moore, Vigolo], des polymères [Saint-Aubin] ou des molécules telles que les dérivés du pyrène [Chen2001b, Herranz].

Les tensioactifs, molécules amphiphiles, permettent de disperser les CNTs dans l'eau jusqu'à de très fortes concentrations. La partie hydrophobe s'adsorbe à la surface des CNTs hydrophobes tandis que la partie hydrophile de ces molécules interagit avec le solvant ou la solution aqueuse (**Figure I-19, C**). L'utilisation de divers tensioactifs est rapportée dans la littérature, ceux-ci pouvant être chargés ou neutres [Sun 2008b, Moore, O'Connell 2001]. Parmi eux, le SDS est actuellement l'un des tensioactifs les plus utilisés. Il permet d'obtenir des dispersions de CNTs largement individualisés [O'Connell 2001]. Il est toutefois nécessaire de se placer au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC) pour disperser convenablement les CNTs, ce qui peut poser de nombreux problèmes pour les applications biologiques. En effet, un excès de tensioactif peut causer la lyse des membranes cellulaires ou la dénaturation des protéines [Dong].

Les polymères permettent de disperser les nanotubes principalement dans des solvants organiques comme dans l'eau. Ils viennent s'enrouler le long du nanotube ou s'adsorber à leur surface (**Figure I-19, D**). Il est par exemple possible de disperser des CNTs à l'aide de polymères tels que le copolymère tribloc Poly(Styrène)-b-poly(Butadiène)-b-poly(méthacrylate de méthyle) (SBM) dans des solvants organiques ou le Poly(Acide Acrylique) (PAA) dans l'eau [Saint-Aubin].

Les molécules aromatiques riches en électrons π ont été largement utilisées pour disperser les CNTs dans l'eau ou les solvants organiques. Les électrons π des molécules aromatiques vont interagir avec les électrons π des CNTs, stabilisant le complexe formé (**Figure I-20**). Les dérivés du pyrène sont parmi les composés les plus rapportés dans la littérature [Chen 2001b, Karousis, Nakashima, Petrov].

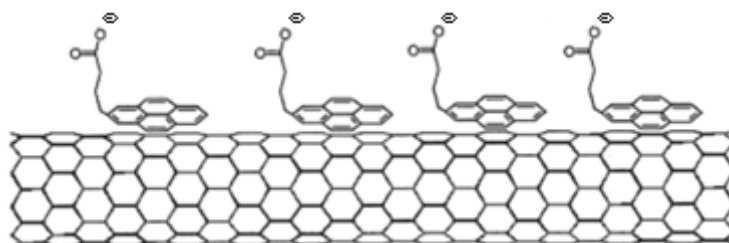


Figure I-20 : Représentation schématique de la fonctionnalisation non covalente à l'aide de dérivés du pyrène.

D'autres molécules permettent de solubiliser les nanotubes de carbone dans l'eau : les protéines [Karousis], les polysaccharides [Yang 2006b], les acides nucléiques [Zheng] ou encore les phospholipides [Liu 2009]. Les phospholipides présentent l'avantage d'être biocompatibles et de s'insérer facilement dans la membrane cellulaire. De plus, ces molécules possèdent de faibles CMC, rendant le recouvrement des CNTs stable même en l'absence d'excès de tensioactifs. Néanmoins la fonctionnalisation par ce type de composés est moins stable dans le temps qu'une fonctionnalisation covalente. De plus, ces molécules ou macromolécules en suspension possédant un caractère amphiphile peuvent interagir avec les molécules d'intérêt biologique.

5.2 FONCTIONNALISATION COVALENTE

La fonctionnalisation covalente implique la création d'une liaison chimique entre les nanotubes de carbone et le groupement greffé. En jouant sur la réactivité chimique des atomes de carbone, cette fonctionnalisation peut mettre en jeu des réactions de chimie organique classique (**Figure I-19, B**) ou des réactions utilisant les défauts structuraux des nanotubes : lacunes, groupements chimiques déjà présents (**Figure I-19, A**).

Les avantages de la fonctionnalisation covalente sont nombreux. Les groupements fonctionnels sont fixés aux CNTs et ne peuvent donc pas se désorber, contrairement à la fonctionnalisation non covalente [O'Connell 2001]. La solubilité des CNTs dans l'eau ou les solvants organiques dépend du type de fonctions et aussi de la quantité de groupements greffés. Cependant, chaque site de greffage transforme un carbone sp^2 en carbone sp^3 , modifiant la structure électronique du CNT, à l'inverse de la fonctionnalisation non-covalente où l'intégrité structurale de la paroi est conservée. Les propriétés électroniques des nanotubes sont donc vite modifiées par la fonctionnalisation covalente [Dyke, Lopez-Bezanilla].

La chimie des nanotubes est extrêmement variée et de nombreuses méthodes de fonctionnalisation ont déjà été rapportées. Ces différentes méthodes offrent différents taux de fonctionnalisation et donnent différentes solubilités. De nombreuses revues existent aujourd'hui traduisant l'importante chimie qui a été développée pour les CNTs [Hirsch, Singh, Tasis]. Les réactions utilisées se répartissent en plusieurs groupes : fluoration, oxydation, cycloaddition, addition radicalaire, réduction. Nous pouvons classer ces réactions covalentes en deux principaux groupes :

- Les réactions de couplage exploitant les défauts de la paroi des CNTs (amidation et estérification des fonctions carboxyliques créées par oxydation)
- Les réactions d'addition sur les atomes de carbone (cycloaddition, addition radicalaire)

Nous ne décrivons ici que les réactions d'estérification et d'amidation sur des CNTs, permettant au final le greffage covalent d'anticorps. Se référer à la revue de Tasis *et al.* pour plus d'informations [Tasis].

- AMIDATION ET ESTERIFICATION

Les réactions d'amidation et d'estérification peuvent se faire à partir des CNTs préalablement oxydés (se référer à la partie scission des CNTs pour plus d'information sur l'oxydation). Les groupements carboxyliques, après activation, peuvent réagir avec des fonctions alcool ou amine pour donner des groupements ester ou amide respectivement. Ces réactions se font préférentiellement au niveau des extrémités des CNTs ou des défauts, où sont localisées le plus grand nombre de fonctions carboxyliques [Bonifazi].

Le couplage de groupes carboxyliques avec des amines ou des alcools peut s'effectuer en utilisant le chlorure de thionyle (SOCl_2) ou des intermédiaires carbodiimides activés (**Figure I-21**).

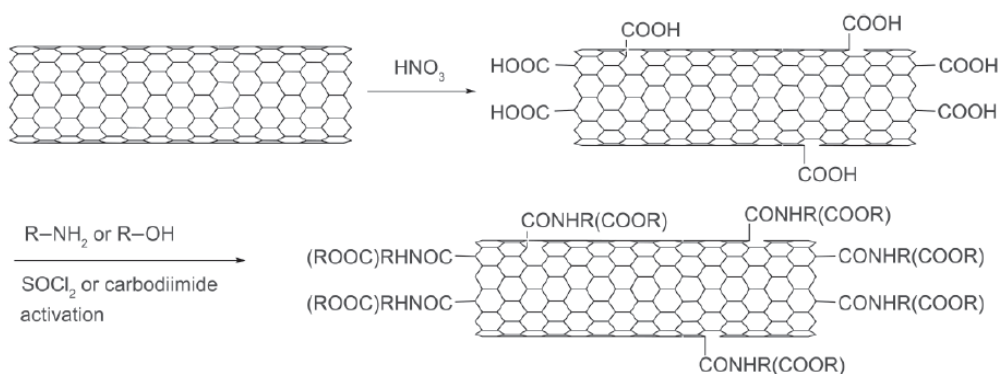


Figure I-21 : Fonctionnalisation covalente de CNTs oxydés par amidation et estérification. [Liu 2009]

En 1999, le groupe de Haddon rapporte la réaction d'amidation entre des SWCNTs courts (≈ 200 nm) et l'octadécylamine via l'utilisation de chlorure de thionyle. Le couplage de la fonction amine de l'octadécylamine sur les SWCNTs permet ensuite leur solubilisation dans de nombreux solvants organiques [Hamon 1999].

Les CNTs peuvent également être fonctionnalisés de cette manière par des molécules telles que des protéines [Venturelli], des peptides ou des fluorophores [Kam]. Ce couplage peptidique entre une fonction carboxylique et un groupement amine nécessite des agents de couplage tels que le N-hydroxysuccinimide (NHS) ou l'hydroxybenzotriazole (HOBt), et des carbodiimides (usuellement le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)). Cette réaction est cruciale pour de nombreuses bio-applications telles que la vectorisation de molécules (« drug delivery system ») [Ménard-Moyon], le développement de biocapteurs [Shao] ou le suivi par imagerie des CNTs [Welsher].

Elle sera utilisée dans cette thèse pour la fonctionnalisation de nanotubes courts par l'accroche d'anticorps monoclonaux.

6 BILAN DU CHAPITRE I

Nous avons vu dans ce chapitre que le raccourcissement de la longueur des nanotubes de carbone pouvait être réalisé par des procédés aussi bien physiques que chimiques. Certains permettent d'obtenir des nanotubes de carbone d'une longueur inférieure à 100 nm en grande quantités mais dégradent profondément leur structure. De plus la dispersion des longueurs obtenues ne permet pas une application au suivi de la plasticité synaptique que nous souhaitons étudier. Un tri des CNTs est ainsi primordial pour sélectionner les plus courts, et l'ultracentrifugation en gradient de densité apparaît être une technique de choix, permettant de sélectionner des nanotubes d'une longueur inférieure à 10 nm.

Nous nous proposons de réduire la longueur des nanotubes de carbone de façon significative par l'utilisation d'ultrasons associée ou non à un traitement chimique oxydant. La sélection des nanotubes les plus courts pourra être obtenue par l'emploi de l'ultracentrifugation en gradient de densité. Ceci devrait nous permettre d'obtenir des nanotubes de carbone courts en quantités suffisantes pour envisager leur fonctionnalisation covalente par des anticorps monoclonaux et au final le suivi de ces assemblages par imagerie photothermique hétérodyne.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Ando, T. *Journal of the Physical Society of Japan* **66**, 1066–1073 (1997).
- Arnold, M. S., Stupp, S. I. & Hersam, M. C. *Nano Letters* **5**, 713–718 (2005).
- Arnold, M. S., Green, A. A., Hulvat, J. F., Stupp, S. I. & Hersam, M. C. *Nature Nanotechnology* **1**, 60–65 (2006).
- Bachilo, S. M., Strano, M. S., Kittrell, C., Hauge, R. H., Smalley, R. E. & Weisman, R. B. *Science* **298**, 2361–2366 (2002).
- Badaire, S., Poulin, P., Maugey, M. & Zakri, C. *Langmuir* **10**, 10367 (2004).
- Banerjee, S. & Wong, S. S. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 12144–12151 (2002).
- Batchelor, G. K. *Journal of Fluid Mechanics* **44**, 419–440 (1970).
- Berciaud, S., Cognet, L., Blab, G. A. & Lounis, B. *Physical Review Letters* **93**, 257402 (2004).
- Berciaud, S., Cognet, L., Tamarat, P. & Lounis, B. *Nano Letters* **5**, 515–518 (2005).
- Berciaud, S., Cognet, L., Poulin, P., Weisman, R. B. & Lounis, B. *Nano Letters* **7**, 1203–1207 (2007).
- Berciaud, S., Cognet, L. & Lounis, B. *Physical Review Letters* **101**, 077402 (2008).
- Boccara, A. C., Fournier, D. & Badoz, J. *Applied Physics Letters* **36**, 130 (1980).
- Bonifazi, D., Nacci, C., Marega, R., Campidelli, S., Ceballos, G., Modesti, S., Meneghetti, M. & Prato, M. *Nano Letters* **6**, 1408 (2006).

- Chen, J., Rao, A. M., Lyuksyutov, S., Itkis, M. E., Hamon, M. A., Hu, H., Cohn, R. W., Eklund, P. C., Colbert, D. T., Smalley, R. E. & Haddon, R. C. *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 2525–2528 (2001a).
- Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D. & Dai, H. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 3838–3839 (2001b).
- Chen, B. & Selegue, J. *Analytical Chemistry* **74**, 4774–4780 (2002).
- Chen, Z., Ziegler, K. J., Shaver, J., Hauge, R. H. & Smalley, R. E. *J. Phys. Chem. B* **110**, 11624–11627 (2006).
- Chun, J., Fagan, J. A., Hobbie, E. K. & Bauer, B. J. *Analytical Chemistry* **80**, 2514–2523 (2008).
- Cognet, L., Berciaud, S., Lasne, D. & Lounis, B. *Analytical Chemistry* **80**, 2288–2294 (2008).
- Criegee, R. *Angewandte Chemie International Edition* **14**, 745 (1975).
- Crum, L. A. *Ultrasonics* **22**, 215 (1984).
- Dong, L., Joseph, K. L., Witkowski, C. M. & Craig, M. M. *Nanotechnology* **19**, 255702 (2008).
- Duesberg, G. S., Muster, J., Krstic, V., Burghard, M. & Roth, S. *Applied Physics A Materials Science & Processing* **67**, 117–119 (1998).
- Dyke, C. A., Stewart, M. P. & Tour, J. M. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4497–4509 (2005).
- Fagan, J. A., Simpson, J. R., Bauer, B. J., Lacerda, S. H. D., Becker, M. L., Chun, J., Migler, K. B., Walker, A. R. H. & Hobbie, E. K. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 10607–10612 (2007).
- Gosh, S., Bachilo, S. M. & Weisman, R. B. *Nature Nanotechnology* **5**, 443–450 (2010).
- Green, A. A., Duch, M. C. & Hersam, M. C. *Nano Research* **2**, 69–77 (2009).
- Hamada, N., Sawada, S.-I. & Oshiyama, A. *Physical Review Letters* **68**, 1579–1581 (1992).
- Hamon, M. A., Chen, J., Hu, H., Chen, Y., Itkis, M. E., Rao, A. M., Eklund, P. C. & Haddon, R. C. *Advanced Materials* **11**, 834–840 (1999).
- Hamon, M. A., Hu, H., Bhowmik, P., Niyogi, S., Zhao, B., Itkis, M. E. & Haddon, R. C. *Chemical Physics Letters* **347**, 8–12 (2001).
- Heller, D. A., Mayrhofer, R. M., Baik, S., Grinkova, Y. V., Usrey, M. L. & Strano, M. S. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 14567–14573 (2004).
- Hennrich, F., Krupke, R., Arnold, K., Rojas Stiiz, J. A., Lebedkin, S., Koch, T., Schimmel, T. & Kappes, M. M. *Journal of Physical Chemistry B* **111**, 1932 (2007).
- Herranz, M. A., Ehli, C., Campidelli, S., Gutierrez, M., Hug, G. L., Ohkubo, K., Fukuzumi, S., Prato, M., Martin, N. & Guldi, D. M. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 66–73 (2008).
- Hilding, J., Grulke, E. A., Zhang, Z. G. & Lockwood, F. *Journal of Dispersion and Technology* **24**, 1 (2003).
- Hirsch, A. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 1853–1859 (2002).
- Hong, S. Y., Tobias, G., Al-Jamal, K. T., Ballesteros, B., Ali-Boucetta, H., Lozano-Perez, S., Nellist, P. D., Sim, R. B., Finunace, C., Mather, S. J., Green, M. L., Kostarelos, K. & Davis, B. G. *Nature Materials* **9**, 485 (2010).
- Hu, C. & Whinnery, J. R. *Applied Optics* **12**, 72 (1973).
- Hu, H., Bhowmik, P., Zhao, B., Hamon, M. A., Itkis, M. E. & Haddon, R. C. *Chemical Physics Letters* **345**, 25–28 (2001).
- Hu, H., Zhao, B., Hamon, M. A., Kamaras, K., Itkis, M. E. & Haddon, R. C. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 14893–14900 (2003).
- Islam, M. F., Rojas, E., Bergey, D. M., Johnson, A. T. & Yodh, A. G. *Nano Letters* **3**, 269 (2003).
- Ju, S. Y., Doll, J., Sharma, I. & Papadimitrakopoulos, F. *Nature Nanotechnology* **3**, 356–362 (2008).
- Kam, N. W. S., Jessop, T. C., Wender, P. A. & Dai, H. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 6850–6851 (2004).
- Karousis, N., Tagmatarchis, N. & Tasis, D. *Chemical Review* **110**, 5366 (2010).
- Kosynkin, D. V., Higginbotham, A. L., Sinitskii, A., Lomeda, J. R., Dimiev, A., Price, B. K. & Tour, J. M. *Nature Letters* **458**, 872–877 (2009).

- Kuang, Y., Liu, J. & Sun, X. *The Journal of Physical Chemistry C* **116**, 24770–24776 (2012).
- Lee, J., Kentish, S. E. & Ashokkumar, M. *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 14595 (2005).
- Li, Y. B., Wei, B. Q., Liang, J., Yu, Q. & Wu, D. H. *Carbon* **37**, 493 (1999).
- Liu, J., Rinzler, A. G., Dai, H., Hafner, J. H., Bradley, R. K., Boul, P. J., Lu, A., Iverson, T., Shelimov, K., Huffman, C. B., Rodriguez-Macias, F., Shon, Y-S., Lee, T. R., Colbert, D. T. & Smalley, R. E. *Science* **280**, 1253 (1998).
- Liu, Z., Tabakman, S., Welsher, K. & Dai, H. *Nano Res* **2**, 85–120 (2009).
- Lopez-Bezanilla, Triozon, F., Latil, S., Blase, X. & Roche, S. *Nano Letters* **9**, 940–944 (2009).
- Lu, K. L., Lago, R. M., Chen, Y. K., Green, M. L., Harris, P. J. F. & Tsang, S. C. *Carbon* **34**, 814 (1996).
- Lu, F., Gu, L., Meziani, M. J., Wang, X., Luo, P. G., Veca, L. M., Cao, L. & Sun, Y. P. *Advanced Materials* **21**, 139 (2009).
- Lucas, A., Zakri, C., Maugey, M., Pasquali, M., van der Schoot, P. & Poulin, P. *Journal of Physical Chemistry C* **113**, 20599–20605 (2009a).
- Lucas, A. *Thèse : Dispersion et Filage continu par coagulation de nanotubes de carbone* (2009b).
- Marques, R. R. N., Machado, B. F., Faria, J. L. & Silva, A. M. T. *Carbon* **48**, 1515 (2010).
- Maruyama, S. <http://www.photon.t.u-tokyo.ac.jp/~maruyama/kataura/kataura.html>
- Mason, T. J. & Lorimer, J. P. *Applied Sonochemistry*, Wiley-VCH, Verlag GmbH (2002).
- Mawhinney, D. B., Baynebjim, V., Jyzbetsivam, A., Yates, J. T. J., Liu, J. & Smalley, R. E. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 2383 (2000).
- Ménard-Moyon, C., Venturelli, E., Fabbro, C., Samori, C., Da Ros, T., Kostarelos, K., Prato, M. & Bianco, A. *Expert Opin. Drug Discovery* **5**, 691 (2010).
- Mintmire, J. W., Dunlap, B. I. & White, C. T. *Physical Review Letters* **68**, 631–634 (1992).
- Moore, V. C., Strano, M. S., Haroz, E. H., Hauge, R. H. & Smalley, R. E. *Nano Letters* **3**, 1379–1382 (2003).
- Nakashima, N., Tomonari, Y. & Murakami, H. *Chemistry Letters* **31**, 638–639 (2002).
- Naumov, A. V., Ghosh, S., Tsyboulski, D. A., Bachilo, S. M. & Weisman, R. B. *ACS Nano* **5**, 1639–1648 (2011).
- Nguyen T. Q. & Kausch H. H. *Polymer* **33**, 2611 (1992).
- O'Connell, M. J., Boul, P., Ericson, L. M., Huffman, C., Wang, Y., Haroz, E., Kuper, C., Tour, J., Ausman, K. D. & Smalley, R. E. *Chemical Physics Letters* **342**, 265–271 (2001).
- O'Connell, M. J., Bachilo, S. M., Huffman, C. B., Moore, V. C., Strano, M. S., Haroz, E. H., Rialon, K. L., Boul, P. J., Noon, W. H., Kittrell, C., Ma, J., Hauge, R. H., Weisman, R. B. & Smalley, R. E. *Science* **297**, 593–596 (2002).
- Odell, J. A., Keller, A. & Rabin, Y. *Journal of Chemical Physics* **88**, 4022 (1988).
- Pagani, G., Green, M. J., Poulin, P. & Pasquali, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 11599–11604 (2012).
- Peng, X., Komatsu, N., Bhattacharya, S., Shimawaki, T., Aonuma, S., Kimura, T. & Osuka, A. *Nature Nanotechnology* **2**, 361–365 (2007).
- Petrov, P., Stassin, F., Pagnouille, C. & Jerome, R. *Chemical Communications* **23**, 2904–2905 (2003).
- Pierard, N., Fonseca, A., Konya, Z., Willems, I., Van Tendeloo, G. & Nagy, J. B. *Chemical Physics Letters* **335**, 1–8 (2001).
- Pierard, N., Fonseca, A., Colomer, J. F., Bossuot, C., Benoit, J. M., Van Tendeloo, G., Pirard, J. P. & Nagy, J. B. *Carbon* **42**, 1691–1697 (2004).
- Price, K. B., Lomeda, J. R. & Tour, J. M. *Chemistry of Materials* **21**, 3917–3923 (2009).
- Reich, S., Thomsen, C. & Maultzsch, J. *Carbon Nanotubes, Basic Concepts and Physical Properties*. Wiley-VCH, (2004).

- Roquelet, C. *Thèse : Transfert d'énergie dans des composites nanotube de carbone/porphyrine, Ecole Normale Supérieure de Cachan* (2012).
- Saint-Aubin, K., Poulin, P., Saadaoui, H., Maugey, M. & Zakri, C. *Langmuir* **25**, 13206–13211 (2009).
- Saito, R., Dresselhaus, G. & Dresselhaus, M.S. *Physical Properties of Carbon Nanotubes* (Imperial College Press) (1998).
- Saito, N., Usui, Y., Aoki, K., Narita, N., Shimizu, M., Hara, K., Ogiwara, N., Nakamura, K., Ishigashi, N., Kato, H., Taruta, S. & Endo, M. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1897 (2009).
- Shaffer, M. S. & Windle, A. H., *Advanced Materials* **11**, 937–941 (1999).
- Shao, N., Wickstrom, E. & Panchapakesan, B. *Nanotechnology* **19**, 465101 (2008).
- Singh, P., Campidelli, S., Giordani, S., Bonifazi, D., Bianco, A. & Prato, M. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2214 (2009).
- Stone, J. *Journal of the Optical Society of America* **62**, 327 (1972).
- Strano, M. S., Dyke, C. A., Usrey, M. L., Barone, P.W., Allen, M. J., Shan, H., Kittrell, C., Hauge, R. H., Tour, J. M. & Smalley, R. E. *Science* **301**, 1519–1522 (2003).
- Sun, X., Zaric, S., Daranciang, D., Welsher, K., Lu, Y., Li, X. & Dai, H. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 6551 (2008a).
- Sun, Z., Nicolosi, V., Richard, D., Bergin, S. D., Aherne, D. & Coleman, J. N. *Journal of Physical Chemistry C* **112**, 10692–10699 (2008b).
- Suryanarayana, C. *Progress in Materials Science* **46**, 1–184 (2001).
- Suslick, K. S. & Price, G. J. *Annual Review Materials Science* **29**, 295 (1999).
- Svedberg, T. & KO, P. *The Ultracentrifuge, Oxford Univ Press*, London (1940).
- Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A. & Prato, M. *Chemical Review* **106**, 1105 (2006).
- Tchoul, M. N., Ford, W. T., Lolli, G., Resasco, D. E. & Arepalli, S. *Chemical Materials* **19**, 5765–5772 (2007).
- Tu, X., Manohar, S., Jagota, A. & Zheng, M. *Nature* **460**, 250–253 (2009).
- Venturelli, E., Fabbro, C., Chaloin, O., Ménard-Moyon, C., Smulski, C. R., Da Ros, T., Kostarelos, K., Prato, M. & Bianco, A. *Small* **7**, 2179 (2011).
- Vigolo, B., Pénicaud, A., Coulon, C., Sauder, C., Pailler, R., Journet, C., Bernier, P. & Poulin, P. *Science* **290**, 1331–1334 (2000).
- Wang, F., Dukovic, G., Brus, L. E. & Heinz, T. F. *Science* **308**, 838–841 (2005).
- Wang, F., Cho, D. J., Kessler, B., Deslippe, J., Schluck, P. J., Louie, S. G., Zettl, A., Heinz, T. F. & Shen, Y. R. *Physical Review Letters* **99**, 227401 (2007).
- Welsher, K., Liu, Z., Daranciang, D. & Dai, H. *Nano Letters* **8**, 586 (2008).
- Worsley, K. A., Kalinina, I., Bekyarova, E. & Haddon, R. C. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 18153 (2009).
- Yang, C-M., An, K. H., Park, J. S., Park, K. A., Lim, S. C., Cho, S-H., Lee, Y. S., Park, W., Park, C. Y. & Lee, Y. H. *Physical Review B* **73**, 075419 (2006a).
- Yang, H., Wang, S. C., Mercier, P. & Akins, D. L. *Chemical Communications*, 1425–1427 (2006b).
- Zhang, G., Qi, P., Wang, X., Lu, Y., Li, X., Tu, R., Bangsaruntip, S., Mann, D., Zhang, L. & Dai, H. *Science* **314**, 974–977 (2006).
- Zheng, M., Jagota, A., Strano, M. S., Santos, A. P., Barone, P., Chou, S. G., Diner, B. A., Dresselhaus, M. S., McLean, R. S., Onoa, G. B., Samsonidze, G. G., Semke, E. D., Usrey, M. & Walls, D. J. *Science* **302**, 1545–1548 (2003).
- Ziegler, K. J., Gu, Z., Shaver, J., Chen, Z., Flor, E. L., Schmidt, D. J., Chan, C., Hauge, R. H. & Smalley, R. E. *Nanotechnology* **16**, S539–S544 (2005).

Chapitre II

Matériels et méthodes pour la caractérisation de nanotubes de carbone ultracourts

1	Sonication	43
2	Analyse thermogravimétrique	43
3	Spectroscopie Raman.....	44
3.1	Principe.....	44
3.2	Application aux nanotubes de carbone	45
3.2.1	Les bandes RBM.....	47
3.2.2	La bande G ou les modes tangentiels.....	47
3.2.3	La bande D.....	48
3.2.4	La bande 2D	48
4	Microscopie à force atomique.....	49
4.1	Principe.....	49
4.2	Modes de mesure.....	50
4.2.1	Mode « contact »	50
4.2.2	Mode « tapping ».....	51
4.3	Préparation des échantillons de nanotubes	51
4.4	Influence de la pointe et correction des longueurs des nanotubes de carbone	52
5	Spectroscopie d'absorption.....	53
6	Electrophorèse.....	54
6.1	Principe.....	54
6.2	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives	54
6.2.1	Le support	54
6.2.2	Préparation des gels.....	55

6.2.3	Préparation des solutions tampon et bleu de dépôt	55
6.2.4	Préparation des échantillons.....	56
7	Méthode d'imagerie photothermique hétérodyne.....	56
7.1	Principe.....	56
7.2	Dispositif expérimental.....	57
7.2.1	Détection en configuration réflexion.....	58
7.2.2	Détection en configuration transmission	58
8	Bibliographie	59

1 SONICATION

Les ultrasons sont appliqués aux dispersions de nanotubes et de tensioactifs en plongeant directement la microsonde dans la dispersion. Le générateur d'ultrasons employé est un Branson « Digital Sonifier S-450D » de puissance maximale $P_{US} = 400\text{ W}$, équipé d'une microsonde en alliage à base de titane d'un diamètre de 3 mm (**Figure II-1**). L'amplitude de vibration varie entre 12% et 30% de l'amplitude de vibration maximale (228 μm) ce qui correspond à une puissance P_{US} de 6W à 24W pour les conditions données. Les ultrasons ne sont pas appliqués de manière continue mais en régime pulsé (pulsations à des intervalles de 500 ms d'application pour 200 ms d'arrêt) pendant 5h ou 10h selon le cas. Un bain de glace est utilisé pour réfrigérer les dispersions pendant l'application des ultrasons et éviter toute évaporation du solvant.

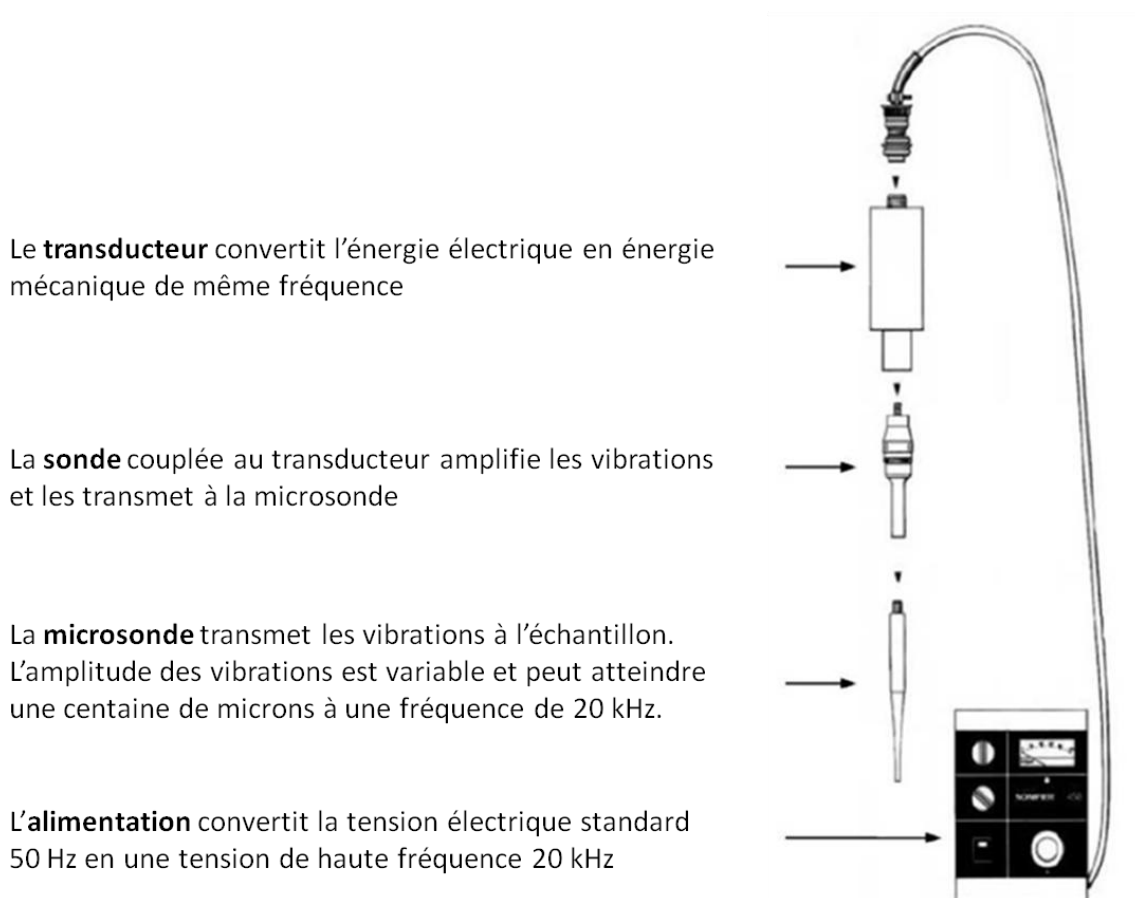


Figure II-1 : Schéma du montage expérimental d'homogénéisation des dispersions par des ultrasons.

2 ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE

L'analyse thermogravimétrique (ou ATG) est une méthode de quantification destructive. Elle consiste à mesurer la variation de la masse sous l'action de l'élévation de la température. Ces mesures peuvent être réalisées sous atmosphère inerte ou oxydante. Sous atmosphère oxydante, les nanotubes sont stables jusqu'à 500-600 °C alors qu'ils sont stables jusqu'à plus

de 2000 °C sous atmosphère inerte. Cette technique d'analyse est très utilisée pour quantifier la quantité de groupements fonctionnels organiques.

Les ATG ont été réalisées sous argon entre 30°C et 900°C grâce à l'appareil Setaram modèle TAG 16. L'appareil est purgé avant chaque analyse en réalisant un cycle vide (0,05 mBar) sous argon. Le flux d'argon est de 15 cm³ par minute et la rampe de température est fixée à 5°C par minute après une stabilisation du système à 30°C pendant une heure. Deux cycles de température avec un plateau à 1000°C pendant une heure permettent de supprimer les erreurs de mesure en soustrayant aux valeurs du premier cycle les valeurs enregistrées au second cycle. Les valeurs de pertes de masse ont été prises à 750°C, température à laquelle les composés organiques sont totalement décomposés sous atmosphère inerte.

3 SPECTROSCOPIE RAMAN

3.1 PRINCIPE

Dans le processus Raman, les photons incidents sont absorbés et leur énergie sert à créer des photons diffusés et à créer (processus Stokes) ou détruire (processus anti-Stokes) des vibrations (ou phonons) dans l'échantillon étudié. La **Figure II-2** schématise les processus ayant lieu lors de l'excitation d'un matériau. La variation d'énergie observée sur le photon nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée.

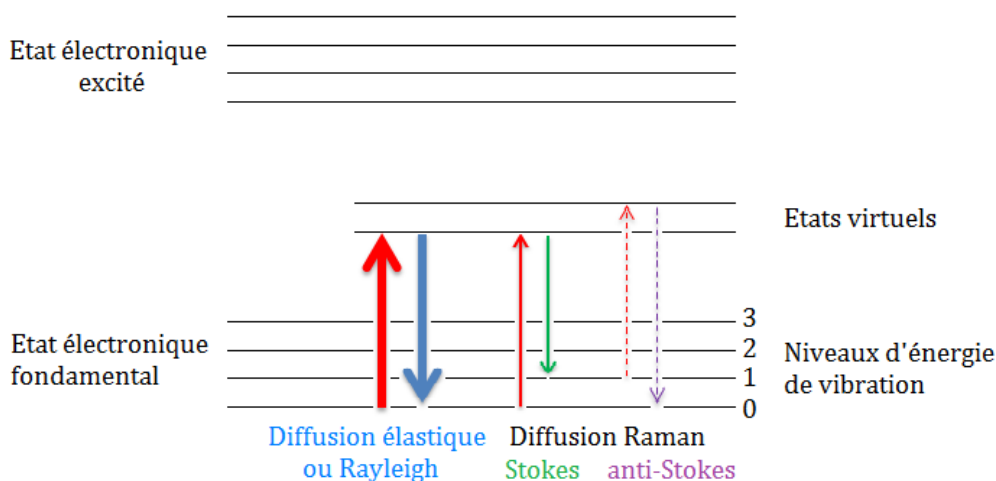


Figure II-2 : Diagramme de Jablonski représentant les processus radiatifs mis en jeu lors de l'analyse d'un signal Raman. L'épaisseur des traits est grossièrement proportionnelle à la force du signal provenant des transitions.

La différence d'intensité des raies Stokes et anti-Stokes est expliquée par la distribution de Boltzmann. En effet, d'après cette distribution, les modes vibrationnels de basse énergie sont les plus peuplés. Les raies Stokes dues à l'excitation d'un niveau vibrationnel de plus basse énergie que lors du processus anti-Stokes sont donc plus intenses que les raies anti-Stokes. Ce sont donc généralement les raies Stokes qui sont analysées sur les spectres Raman. La faible intensité des raies Raman est le principal inconvénient de cette technique. Ce problème peut cependant être contourné en utilisant un phénomène de résonance. Lorsque l'énergie excitatrice est proche de celle des transitions électroniques de la molécule, il y a accroissement de l'intensité Raman observée par un effet de résonance. On parle alors de Raman résonant. Ce phénomène est en particulier utilisé pour l'étude des nanotubes et du graphène par spectroscopie Raman.

Cette technique est en pratique non destructive et permet de travailler avec des petites quantités de matière. Elle peut être associée à un microscope et permet ainsi de focaliser l'analyse sur quelques μm^2 , on parle alors de micro-Raman. L'échantillon est excité par une lumière monochromatique à l'aide d'un laser. Les longueurs d'onde utilisées peuvent varier du proche ultra-violet au proche infrarouge. La lumière émise par l'échantillon excité est collectée sur une lentille et envoyée vers un monochromateur.

Les mesures ont été faites à température ambiante à l'aide d'un spectromètre Raman de marque Horiba Jobin Yvon XploRA, fonctionnant avec trois lasers émettant à 532, 638 et 785 nm. Les échantillons de nanotubes ont été analysés à 638 nm et 785 nm en solution dans des cuves en quartz de 2 mm.

3.2 APPLICATION AUX NANOTUBES DE CARBONE

Dans le cas des nanotubes, la diffusion de Stokes résulte de vibrations suivant les directions transversale radiale, transversale axiale et longitudinale des liaisons C-C (**Figure II-3**).

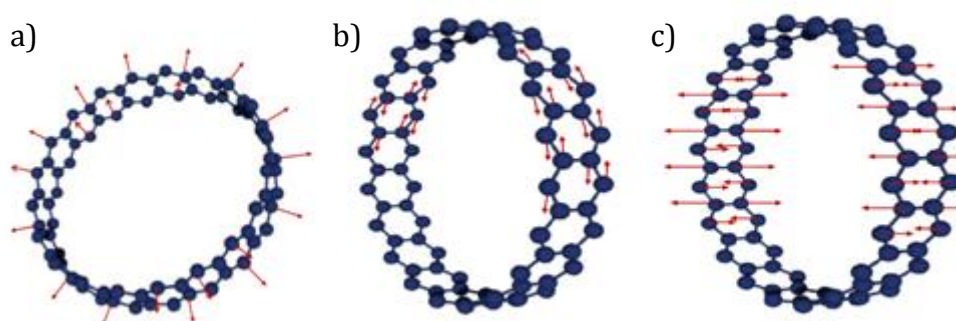


Figure II-3 : Représentation des modes de vibrations usuels des nanotubes analysés par Raman résonant, a) mode de respiration radiale (RBM), b) mode de vibration tangentiel transverse, c) mode de vibration tangentiel longitudinal.

Parmi ces modes, toutes les vibrations ne sont pas observables et seules quelques unes respectent les règles de sélection. Pour améliorer l'intensité du signal Raman, l'énergie du laser est choisie pour sonder une énergie riche en électrons dans le diagramme de densité d'états. Dans le cas des nanotubes, la spectroscopie Raman est un phénomène résonant couplé avec les transitions optiques permises. En effet, d'après les travaux de Kataura [Kataura] la taille des nanotubes et également les positions des singularités de van Hove interviennent dans le phénomène d'excitation utilisé pour la spectroscopie Raman. Ainsi, suivant l'énergie des photons et le diamètre des nanotubes, seuls certains nanotubes sont résonants et donnent un signal Raman. Connaissant le diamètre des nanotubes et l'énergie du laser, le diagramme de Kataura donne la population de nanotubes sondés, métalliques ou semiconducteurs, ainsi que le niveau d'énergie des nanotubes mis en jeu (**chapitre I Figure I-7 p. 14**).

Lorsque la quantité de défauts (carbones sp^3) devient importante (comme par exemple pour les forts taux de fonctionnalisation), le signal Raman diminue de manière globale à cause de la perte de résonance des nanotubes provoquée par la dégradation de leur structure électronique [Burghard, Graupner].

Les spectres Raman des nanotubes de carbone présentent plusieurs zones (**Figure II-4**) :

- les modes de vibrations radiales de 100 à 400 cm^{-1} (RBM),
- la bande D autour de 1300 cm^{-1} ,
- la bande G autour de 1580 cm^{-1}
- la bande 2D, notée aussi G^* ou G' , autour de 2600 cm^{-1}

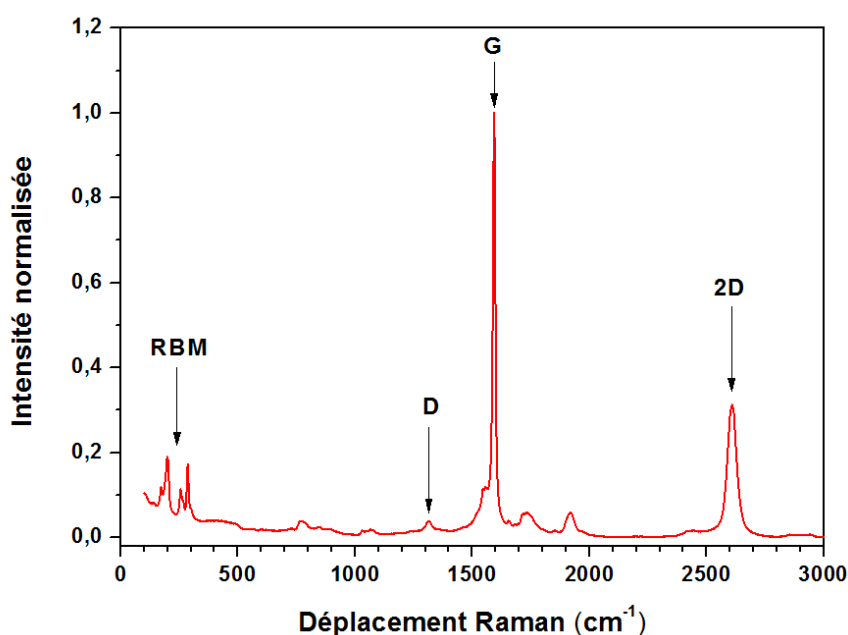


Figure II-4 : Spectre Raman pour une excitation à 638 nm d'un échantillon de nanotubes de carbone mono-paroi bruts produits par synthèse HiPCO.

3.2.1 LES BANDES RBM

Ces bandes correspondent aux modes de respiration radiale (RBM, « Radial Breathing Mode » en anglais) et sont situées entre 100 et 400 cm⁻¹ sur le spectre Raman comme indiqué précédemment. Les liaisons C-C vibrent dans la direction radiale de l'axe du nanotube (**Figure II-3 a**). Plusieurs études ont montré que la fréquence de ces bandes RBM est inversement proportionnelle au diamètre du nanotube selon l'expression suivante :

$$\omega_{RBM} = \frac{A}{d} + B$$

ω_{RBM} correspond au nombre d'onde de la bande de vibration du nanotube considéré, d est le diamètre du nanotube. A et B sont deux constantes déterminées expérimentalement et dépendent des conditions de mesure (nanotubes en poudre, en solution ou isolés) [Jorio]. Les RBM sont également très sensibles aux modifications de la surface créées par des liaisons chimiques ou physiques. En particulier, la présence de défauts ou de groupements fonctionnels greffés de manière covalente affecte plus ces modes de vibrations que les autres modes tangentiels et leur intensité diminue plus rapidement [Graupner].

La spectroscopie Raman est donc une technique permettant la détermination de la distribution en diamètre et de la structure complète (n, m) des nanotubes (à l'aide du diagramme de Kataura décrit plus tôt). Le signal des bandes RBM augmente fortement s'il y a résonance. Elles sont donc fortement dépendantes de l'énergie d'excitation du laser.

3.2.2 LA BANDE G OU LES MODES TANGENTIELS

La bande G (bande Graphite) correspond au signal sp² dans un réseau de carbone conjugué et est présente dans le graphite duquel elle tire son nom. Elle correspond à l'élongation des liaisons C-C dans des directions tangentielles au nanotube, comme le montrent les **Figures II-3 b**) et **II-3 c**). La bande G des nanotubes de carbone mono-paroi est asymétrique. Le pic peut ainsi être divisé en deux composantes : les bandes G⁺ et G⁻. La bande G⁺ située à environ 1590 cm⁻¹ correspond à la vibration tangentielle longitudinale des liaisons C-C. La bande G⁻ située vers 1570 cm⁻¹ correspond à la vibration tangentielle transverse des liaisons C-C. Ces bandes sont très sensibles aux caractères semiconducteur ou métallique et au diamètre des nanotubes. La **Figure II-5** montre deux spectres Raman des bandes G⁺ et G⁻ d'un nanotube semiconducteur et d'un nanotube métallique. Des analyses ont montré qu'il est possible d'établir une relation entre le diamètre des nanotubes et la fréquence des bandes G⁺ et G⁻ [Dresselhaus].

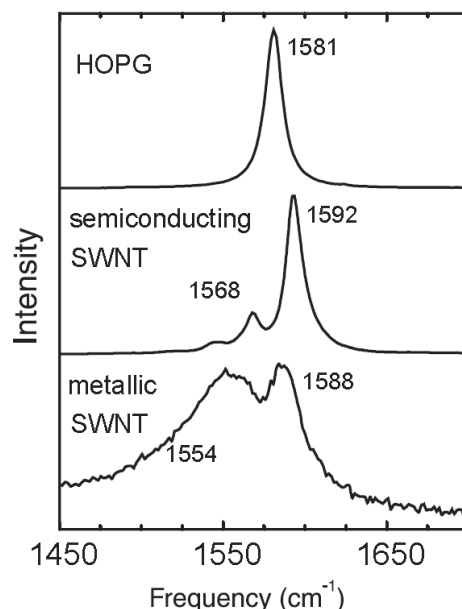


Figure II-5 : Spectres Raman de la bande G du graphite (HOPG), d'un SWCNT semiconducteur (au milieu) et d'un SWCNT métallique (en bas). [Dresselhaus]

3.2.3 LA BANDE D

La bande D (bande Diamant) correspond au signal des carbones sp^3 présents dans un cristal de carbone comme le diamant. Dans le cas du graphite ou des nanotubes, cette bande, située entre 1300 et 1400 cm^{-1} , correspond aux carbones sp^3 présents dans la structure de carbones sp^2 du feuillet de graphène enroulé. On parle ainsi de bande de défauts.

L'intensité de la bande D est utilisée pour estimer la fonctionnalisation covalente. Les discussions sur la fonctionnalisation covalente des nanotubes utilisent le rapport de l'intensité de la bande D (I_D) par rapport à la bande G (I_G) pour qualifier la fonctionnalisation. Plus ce rapport augmente et plus la fonctionnalisation est importante. Cependant les fortes fonctionnalisations entraînent une perte de la résonance de la bande G [Strano]. Certains auteurs préfèrent ainsi normaliser la bande D par rapport à la bande 2D qui est censée être moins affectée par la perte de résonance [Maultzsch].

Le rapport I_D/I_G peut également être un indicateur du raccourcissement des nanotubes de carbone [Chou]. Son utilisation sera développée plus en détails dans le **chapitre III** de cette thèse.

3.2.4 LA BANDE 2D

La bande 2D, ou suivant les auteurs G' ou G^* , correspond à la seconde harmonique de la bande D. A la différence de la bande D, elle ne dépend pas des défauts sp^3 et elle est moins sensible aux pertes de résonance engendrées par les fortes quantités de défauts. Elle apparaît suite à un processus de double résonance impliquant deux phonons, alors que la

bande D est provoquée par un processus de double résonance impliquant un phonon et un défaut.

4 MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

4.1 PRINCIPE

La microscopie à force atomique permet d'imager en 3D la structure des surfaces à l'échelle moléculaire et est basée sur la mesure des forces d'interactions, attractives ou répulsives (van der Waals, électrostatique, magnétique), existant entre une pointe et la surface à analyser. La pointe est fixée à l'extrémité d'un levier (cantilever) flexible très sensible, et doit être la plus fine possible afin que l'interaction soit locale. Elle se déplace au voisinage ou au contact de la surface de l'échantillon. Le levier permet d'amplifier les mouvements de la pointe. Une photodiode sensible à la position mesure la déflexion d'un faisceau laser se réfléchissant sur la surface libre du levier, celui-ci agissant comme le bras d'un levier optique [Jandt]. La photodiode est divisée en quatre quadrants afin de détecter les déplacements verticaux et latéraux du levier (**Figure II-6**). L'échantillon étudié est placé sur une cale piézo-électrique permettant de le déplacer suivant les trois directions x, y et z. Ainsi, en évaluant en tout point la déflexion du laser, il est possible de constituer une cartographie de haute résolution des forces s'exerçant entre les atomes de la pointe et ceux de la surface. La représentation en code couleur de ces forces permet d'obtenir une image de la surface.

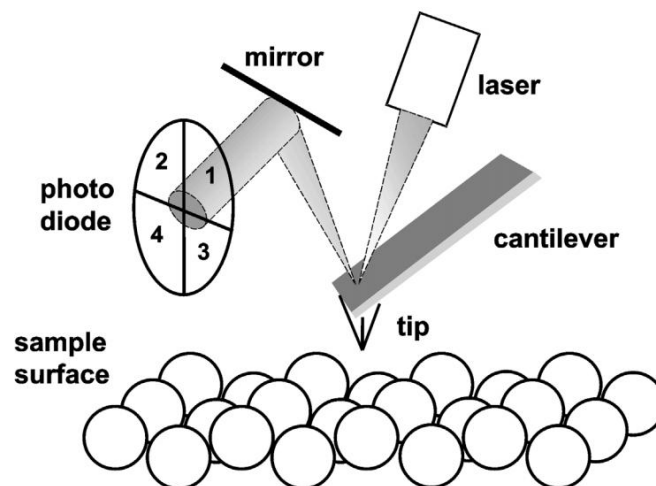


Figure II-6 : Représentation schématique d'un microscope à force atomique. [Jandt]

4.2 MODES DE MESURE

On distingue deux principaux modes en imagerie AFM : le mode « contact » et le mode « tapping » (**Figure II-7**).

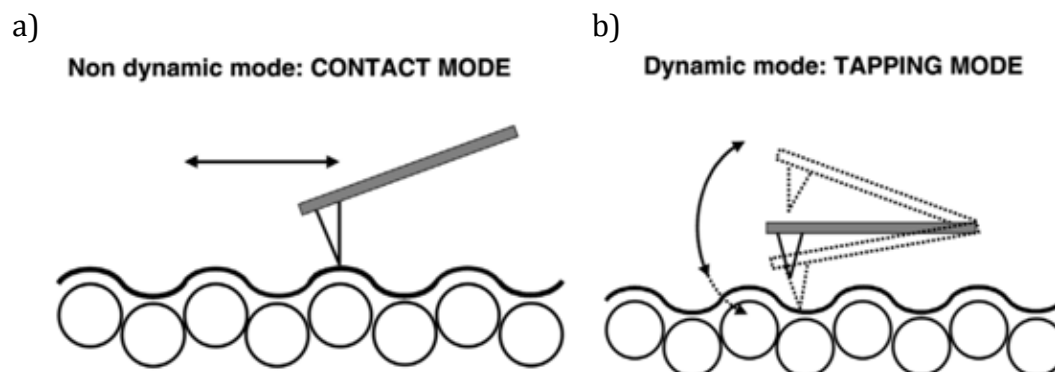


Figure II-7 : a) Mode « contact » en AFM. La pointe est en contact permanent avec l'échantillon. b) Mode « tapping » en AFM. La pointe oscille et n'est pas en contact permanent avec l'échantillon. [and]

4.2.1 MODE « CONTACT »

La pointe est en contact permanent avec l'échantillon. La force d'interaction entre la pointe et la surface peut être évaluée en mesurant la déflexion verticale Δz du levier. La force $F(N)$ s'exerçant sur la pointe est représentée par l'équation de la loi de Hooke :

$$F = k \times \Delta z$$

avec k la constante de raideur du levier ($N.m^{-1}$)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Permet de grandes vitesses de balayage (rapidité d'acquisition) - Seule technique AFM qui permet d'atteindre la résolution atomique - Les échantillons rugueux avec de grandes variations en z peuvent être imagés plus facilement qu'avec les autres modes de fonctionnement. 	<ul style="list-style-type: none"> - Les forces latérales sont importantes et peuvent générer des artefacts sur l'image - La force normale due à l'interaction pointe/échantillon peut être accentuée à l'air à cause d'une couche d'eau adsorbée à la surface (force de capillarité) - La combinaison des forces latérales et d'une force normale élevée peut engendrer une dégradation de la résolution spatiale et un endommagement des échantillons mous (échantillons biologiques, polymères...)

Tableau II-1 : Avantages et inconvénients du mode « contact » en AFM.

4.2.2 MODE « TAPPING »

Le mode « tapping », aussi appelé mode oscillant ou mode de contact intermittent, consiste à exciter le levier à une fréquence proche de sa fréquence de résonance (entre 280 et 500 Hz suivant les ressorts). Le levier se met alors à osciller et la pointe entre en contact avec la surface à la fréquence de l'oscillation. L'interaction entre la pointe et l'échantillon modifie alors l'amplitude des oscillations du ressort. Ces modifications sont enregistrées par l'asservissement, ce qui permet d'obtenir une image de la surface. Le contact intermittent entre la pointe et la surface limite le risque de dégradation ou de destruction des objets étudiés. Ce mode est toutefois difficile à employer en cellule liquide, puisque les oscillations vont provoquer des bruitages autour de la pointe, entraînant une difficulté à enregistrer une image de la surface.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Hautes résolutions latérales (1 nm à 5 nm) - Les forces appliquées sont faibles et provoquent moins de dommage sur les échantillons mous (échantillons biologiques, polymères...) - Les forces latérales sont éliminées et ne provoquent pas d'usure par friction - La pointe passe moins de temps en contact (ou à proximité) de la surface ce qui permet de limiter son usure dans le temps 	<ul style="list-style-type: none"> - Balayage très long comparé au mode contact (temps d'acquisition très long pour de larges scans). Ceci est dû au régime transitoire du microlevier, c'est-à-dire au temps de stabilisation de l'oscillateur lors de l'acquisition d'une image

Tableau II-2 : Avantages et inconvénients du mode « tapping » en AFM.

C'est avec le mode « tapping » sur un microscope Bruker Veeco Dimension Icon que nous avons imagé les nanotubes de carbone de nos fractions avec l'aide de Hassan Saadaoui.

4.3 PREPARATION DES ECHANTILLONS DE NANOTUBES

Le procédé de spin-coating permet de préparer des couches minces uniformes sur des substrats plats (**Figure II-8**). C'est la méthode que nous avons choisie pour préparer les échantillons de nanotubes avant de les caractériser par AFM. Il existe une grande variété de substrats tels que le verre, le graphite, le silicium ou le mica par exemple. Notre choix s'est porté sur le mica car il est facile d'obtenir avec ce matériau une surface plane et propre à l'échelle atomique après clivage. En effet la taille d'objets nanométriques peut être faussée par la topographie environnante à ces objets, l'utilisation de substrats rugueux pouvant induire une distorsion de leur résolution.

Nous clivons tout d'abord avec du scotch une plaque de mica de 1 cm de côté jusqu'à obtenir une surface la plus plane possible. Une goutte de solution de nanotubes est alors déposée sur le mica, puis l'appareil est mis en fonctionnement jusqu'à une vitesse de rotation de 600 tours/min pendant 1 min. Cette vitesse est dans un premier temps augmentée à 1800 tours/min pendant 2 min pour évacuer l'excès de solution puis à 5000 tours/min pendant 4 min pour une évaporation plus rapide tandis que nous rinçons le mica avec 2-3 mL d'éthanol afin d'éliminer le tensioactif enrobant les nanotubes. L'échantillon est prêt à être observé.

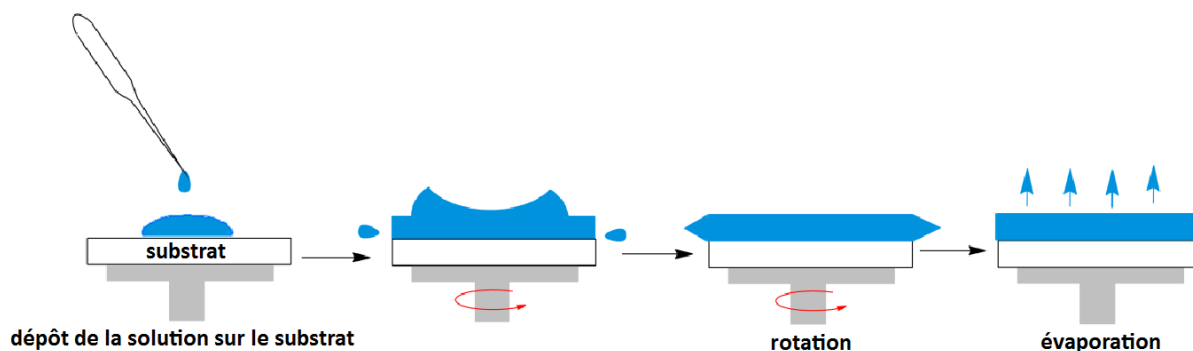


Figure II-8 : Principe de la méthode du spin-coating.

4.4 INFLUENCE DE LA POINTE ET CORRECTION DES LONGUEURS DES NANOTUBES DE CARBONE

La forme et la taille de la pointe sont des paramètres essentiels pour la microscopie à force atomique. Afin que l'analyse se fasse localement à l'échelle atomique, il faut que la pointe soit la plus fine possible. Sa forme géométrique influence fortement la nature des images de surface obtenues. Ainsi de grandes différences entre la topographie visualisée et la topographie réelle peuvent être introduites (**Figure II-9**).

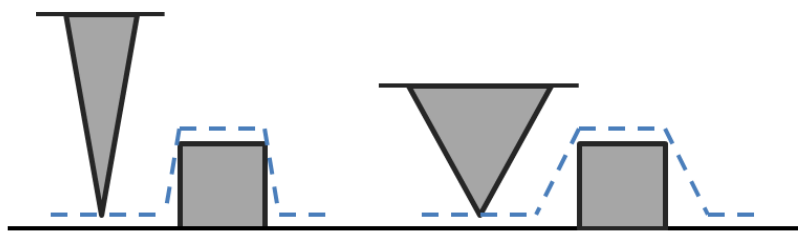


Figure II-9 : Elargissement de la taille réelle des échantillons par effet de pointe.

L'usure de la pointe, favorisée par la phase « d'atterrissage » sur la surface et le balayage, est également à prendre en compte car elle peut créer des artefacts.

Nous utilisons une pointe d'apex sphérique de 7 nm de rayon en silicium pour imager les nanotubes de carbone. La longueur apparente des objets sur l'image d'AFM est influencée par la dimension de la pointe, d'autant plus que la longueur des nanotubes est faible. Il est

donc nécessaire de corriger les longueurs des nanotubes de carbone que nous obtenons en AFM. Winzer *et al.* utilisent un modèle simple permettant la correction de longueurs de brins d'ADN que nous appliquons aux CNTs. Nous considérons que l'apex de la pointe est en contact avec le nanotube et que le nanotube constitue un obstacle de hauteur $h = 2r_{NT}$ (**Figure II-10**) [Winzer].

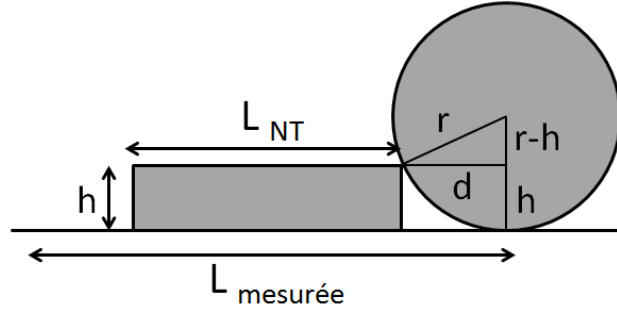


Figure II-10 : Modèle géométrique pour la correction des longueurs mesurées en AFM.

Dans ce cas, la longueur du nanotube mesurée par AFM est donnée par :

$$L_{mesurée} = L_{NT} + 2d$$

Avec L_{NT} la longueur réelle du nanotube, et d la distance entre le nanotube et le point de contact pointe-substrat valant, par résolution du théorème de Pythagore, $\sqrt{h(2r - h)}$.

D'où :

$$L_{NT} = L_{mesurée} - 2\sqrt{h(2r - h)}$$

Ainsi :

$$L_{NT} = L_{mesurée} - 4\sqrt{r_{NT} \times (r - r_{NT})}$$

Nous corrigeons donc les longueurs mesurées sur les images AFM en soustrayant $4\sqrt{r_{NT} \times (r - r_{NT})}$. Ces résultats sont présentés dans le **chapitre III p. 69**.

5 SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION

Les spectres d'absorption des dispersions de nanotubes ont été obtenus avec le spectrophotomètre Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) dans une cellule de quartz de 1 cm.

6 ELECTROPHORESE

6.1 PRINCIPE

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique, mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne leur migration. La vitesse de migration varie en fonction différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physicochimiques), ce qui permet la séparation des différentes molécules. Cette migration peut se faire en conditions natives ou en conditions dénaturantes. Dans le second cas, un agent dénaturant tel que le SDS (pour la séparation des protéines) est ajouté au tampon. Nous ne décrivons ici que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives (PAGE, pour Polyacrylamide Gel Electrophoresis en anglais).

6.2 ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITIONS NATIVES

Les anticorps, dans notre cas, sont séparés dans leur état le plus proche possible de leur état natif par PAGE. Les étapes préalables permettant l'obtention de la solution contenant les molécules à séparer doivent éviter les conditions dénaturantes. Sauf cas particulier, il faut donc éviter les pH élevé ou au contraire très bas, les traitements à des températures élevées, les hautes forces ioniques (fortes concentrations en sel) et les agents chimiques dénaturants.

6.2.1 LE SUPPORT

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer. Dans le cas de macromolécules telles que les anticorps, l'emploi de gels est indiqué. Les gels forment un maillage tridimensionnel composé de pores à travers lesquels les molécules doivent progresser. Plus les molécules sont encombrantes, plus leur progression est difficile donc lente. Il arrive même un moment où leur encombrement ne leur permet plus de progresser du tout. Au-delà de cette limite il n'y a donc aucune séparation. A l'inverse, des molécules très petites comparé aux pores ne seront pratiquement pas freinées, et par la suite mal séparées. En fonction de la taille des pores, il est donc possible de séparer efficacement des molécules situées dans une gamme approximative de masses moléculaires.

La réalisation d'un gel de polyacrylamide se fait par polymérisation d'une solution d'acrylamide avec du bisacrylamide. L'acrylamide-bisacrylamide forme alors des réseaux

plus ou moins réticulés en fonction de la concentration de départ en acrylamide, permettant la séparation de molécules plus ou moins massives (*Tableau II-3*).

Pourcentage d'acrylamide (%)	Gamme de séparation (en kDa)
7,5	45 - 400
10	22 - 300
12	13 - 200
15	2,5 - 100

Tableau II-3 : Gamme de séparation des molécules en fonction de la concentration en acrylamide.

Après plusieurs essais de migration sur gel, nous choisissons un pourcentage d'acrylamide de 8% pour séparer nos complexes nanotubes-anticorps.

6.2.2 PREPARATION DES GELS

Le gel de séparation à 8% d'acrylamide (resolving gel) est préparé par mélange de 2 mL d'une solution de 40% acrylamide/bis-acrylamide, 2,5 mL d'une solution aqueuse de Tris (1,5M) à pH 8,8 et 5,34 mL d'eau milliQ. 10 μ L de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine et 100 μ L de persulfate d'ammonium à 10% sont ajoutés à la solution juste avant le coulage du gel, entre 2 plaques de verres (espacées de 0,75 mm), pour amorcer la polymérisation.

Un gel de concentration (stacking gel) est également préparé par mélange de 0,5 mL d'une solution de 40% acrylamide/bis-acrylamide, 1,26 mL d'une solution aqueuse de Tris (0,5M) à pH 6,8 et 3,18 mL d'eau. Il est coulé en haut du gel de séparation pour permettre une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation. Des pistes individuelles (puits) sont réalisées par l'utilisation d'un "peigne" qui sépare le gel en portions égales destinées à la migration de chaque échantillon. Le gel final est alors placé dans la cuve d'électrophorèse.

6.2.3 PREPARATION DES SOLUTIONS TAMPON ET BLEU DE DEPOT

Une solution tampon d'électrophorèse est préparée en dissolvant 6,05 g de Tris (0,05 M), 26,6 g de glycine (0,38 M) dans 1L d'eau milliQ. Le pH est ajusté à 8,9 par ajout d'une solution aqueuse de NaOH (6M). Cette solution est versée dans la cuve d'électrophorèse avant migration.

Le bleu de dépôt, permettant de suivre les anticorps lors de la migration, est préparé par mélange de 5 mL de glycérol, 2,13 mL de solution aqueuse Tris (0,5 M), 2,7 mL d'eau milliQ et une faible quantité de bleu de bromophénol (traces).

6.2.4 PREPARATION DES ECHANTILLONS

500 μL de solution concentrée à environ $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CNTs sont au préalable mélangés avec 66 ng d'EDC pendant 5 minutes, puis 3,3 μL d'une solution aqueuse d'anticorps Panitumumab concentrée à $20 \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ sont ajoutés (pour avoir au final 2 $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$ d'anticorps). Le mélange réactionnel est agité pendant 2h et 15 μL du mélange sont au final prélevés pour la migration sur gel.

15 μL de solution sont mélangés à 4 μL de bleu de dépôt et déposés dans le puits du gel. La migration est effectuée avec une tension de 90V pendant 12h. La migration des anticorps est ensuite révélée par trempage du gel et coloration dans une solution de bleu de Coomassie (500 mL d'éthanol 96°, 100 mL d'acide acétique glacial, 400 mL d'eau milliQ et 2,5 g de Coomassie) pendant la nuit, puis trempage dans une solution de lavage (150 mL d'éthanol 96°, 100 mL d'acide acétique glacial et 750 mL).

7 METHODE D'IMAGERIE PHOTOTHERMIQUE HETERODYNE

La méthode d'Imagerie Photothermique Hétérodyne permet d'imager des nano-objets tels que des nanocristaux semiconducteurs, des nanoparticules d'or ou d'argent [Cognet]. Cette méthode permet également de détecter les CNTs par excitation à résonance de leur section efficace d'absorption, et ce avec de très bons rapports signal à bruit (>100) [Oudjedi]. Nous présentons dans cette partie le principe de l'imagerie photothermique hétérodyne ainsi que le dispositif expérimental utilisé pour les expériences d'imagerie photothermique hétérodyne menées sur des CNTs longs et courts.

7.1 PRINCIPE

Cette technique utilise deux lasers (**Figure II-11**). Un faisceau laser vert, fortement absorbé, est focalisé sur l'échantillon. Ce faisceau est modulé à une fréquence Ω de quelques centaines de kHz. Si une nanoparticule se trouve au point d'observation, elle absorbe de l'énergie et s'échauffe (quelques degrés dans les conditions standard). La chaleur est évacuée autour de la particule ce qui induit une modification de l'indice optique de réfraction n du milieu environnant sur une distance typique de quelques dizaines de nm. Un second faisceau laser focalisé est utilisé pour la détection, hors résonance. S'il traverse une

région d'indice optique modifié à cause de l'élévation de température, la lumière est diffusée. Le champ électromagnétique diffusé et modulé se propage alors dans toutes les directions. Le champ sonde vient interférer avec ce champ diffusé pour générer un phénomène de battement optique. La lumière arrivant sur la photodiode utilisée pour la détection comporte ainsi une importante composante continue et une très faible composante à la fréquence de modulation. Une détection synchrone (ou *lock-in amplifier*) est utilisée, permettant d'extraire cette très faible composante à la fréquence de référence du signal de la photodiode.

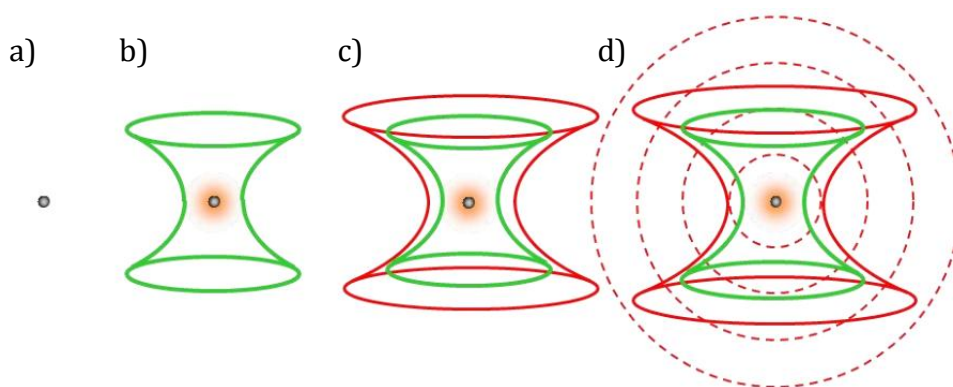


Figure II-11 : Principe de détection d'une nanoparticule (a)) grâce à l'effet photothermique. b) un laser modulé de longueur d'onde proche de la résonance plasmon de la nanoparticule (en vert) est focalisé. Ceci induit un chauffage autour de la particule qui se traduit par une variation de l'indice optique local (sphère d'indice en orangée). c) Le faisceau sonde (en rouge) est focalisé au même endroit que le faisceau d'excitation et est en partie diffusé dans toutes les directions. d) L'interaction du champ diffusé modulé avec le champ sonde est ensuite détectée. [Oudjedi]

7.2 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le montage optique principal (**Figures II-12 et II-13**) est inspiré d'un montage confocal à deux couleurs. Il repose sur la superposition des deux lasers, rouge (HeNe, 632,8 nm) et vert (Nd : Yag doublé, 532 nm), au moyen d'un miroir dichroïque. Le laser d'excitation ou de chauffage (vert) est modulé à 700 kHz au moyen d'un modulateur acousto-optique (MAO) piloté par un générateur basses fréquences. Il permet d'exciter les nanotubes (6,5) à proximité de leur seconde transition optique. Les deux faisceaux sont focalisés sur l'échantillon au moyen d'un objectif de microscope de grande ouverture numérique (x60, Zeiss, ON = 1,49). L'échantillon est monté sur une platine piézo-électrique 3D, les directions X et Y étant pilotées par ordinateur. La détection dépend de la configuration utilisée.

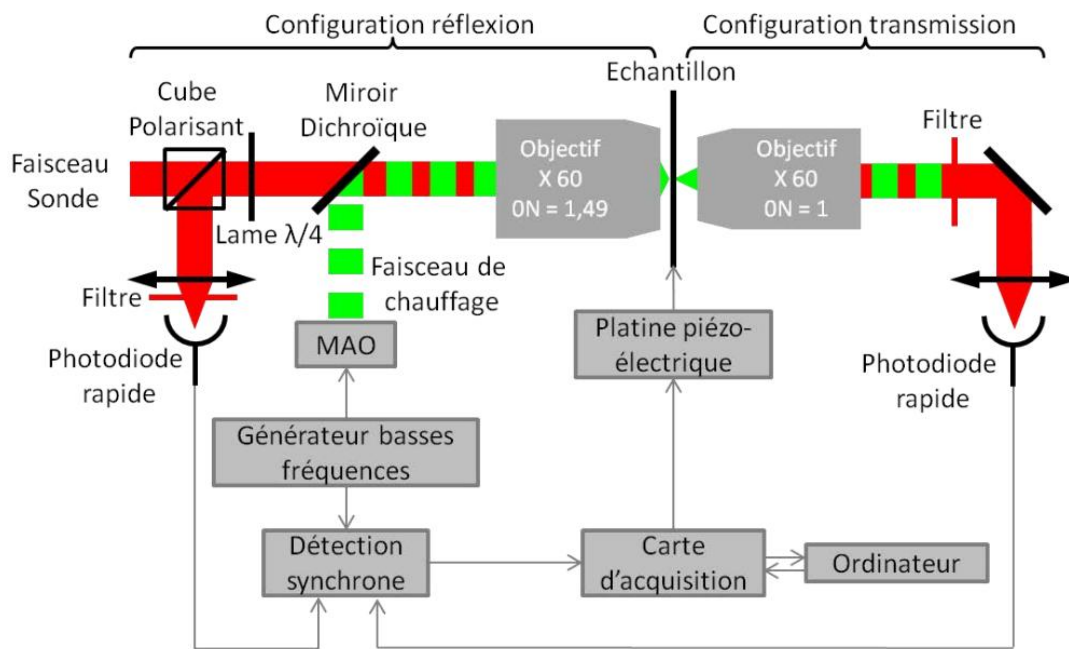


Figure II-12 : Schéma du dispositif d'imagerie photothermique hétérodyne. [Oudjedi]

7.2.1 DETECTION EN CONFIGURATION REFLEXION

Le champ diffusé rayonne dans toutes les directions, y compris vers l'arrière, dans la direction d'où arrivent les lasers. Une partie du faisceau sonde est réfléchi par la surface de l'échantillon et repart vers l'amont du système. Un dispositif anti-retour (lame $\lambda/4$ et cube séparateur de polarisations) utilisé sur le trajet du faisceau permet de séparer ces deux composantes du faisceau entrant et les focaliser sur une photodiode au niveau de laquelle le battement entre ces deux champs est détecté. Un filtre placé devant la photodiode élimine la composante réfléchi du faisceau de chauffage.

C'est la méthode développée à l'origine qui permet de détecter des nano-objets proche de la surface de la lamelle de microscope.

7.2.2 DETECTION EN CONFIGURATION TRANSMISSION

Cette configuration est intéressante lorsque l'on étudie des nano-objets éloignés de l'interface situés dans le volume d'un échantillon épais (comme en milieu cellulaire). Dans ce cas, un deuxième objectif de microscope à immersion dans l'eau (x60, ON= 1) est placé au dessus de l'échantillon pour collecter le champ diffusé vers l'avant et la partie du faisceau sonde qui est transmise au travers de l'échantillon. Les deux faisceaux sont également focalisés sur une photodiode rapide, munie d'un filtre passe-haut permettant de bloquer le faisceau de chauffage.

C'est la configuration qui est utilisée pour imager les nanotubes de carbone de nos échantillons cellulaires présentés dans le **Chapitre IV** de ce manuscrit.

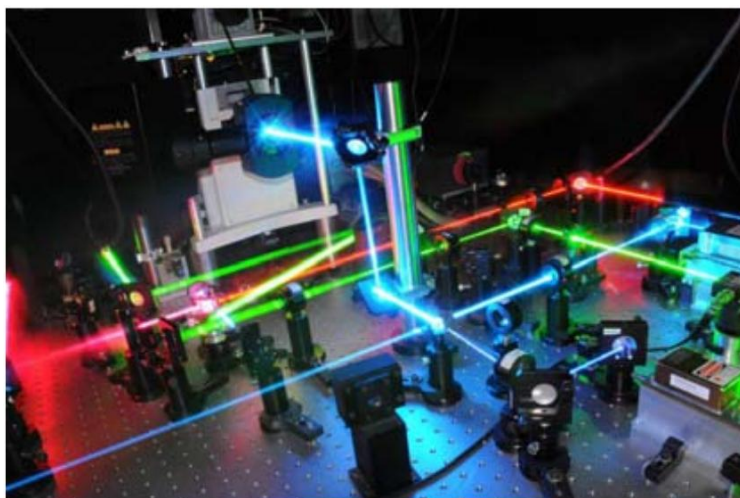


Figure II-13 : Montage optique de la méthode PHI. [Oudjedi]

8 BIBLIOGRAPHIE

- Burghard, M. *Surface Science Reports* **58**, 1–109 (2005).
- Chou, S. G., Son, H., Kong, J., Jorio, A., Saito, R., Zheng, M., Dresselhaus, G. & Dresselhaus, M. *Applied Physics Letters* **90**, 131109 (2007).
- Cognet, L., Berciaud, S., Lasne, D. & Lounis, B. *Analytical Chemistry* **80**, 2288–2294 (2008).
- Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., Saito, R. & Jorio, A. *Physics Reports* (2004).
- Graupner, R. *Journal of Raman Spectroscopy* **38**, 673–683 (2007).
- Jandt, K. D. *Surface Science* **491**, 303–332 (2001).
- Jorio, A., Fantini, C., Pimenta, M. A., Capaz, R. B., Samsonidze, G. G., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M. S., Jiang, J., Kobayashi, N., Grüneis, A. & Saito, R. *Physical Review B* **71**, 075401 (2005).
- Kataura, H., Kumazawa, Y., Maniwa, Y., Umez, I., Suzuki, S., Ohtsuka, Y. & Achiba, Y. *Synthetic Metals* **103**, 2555–2558 (1999).
- Maultzch, J., Reich, S., Thomsen, C., Webster, S., Czerw, R., Carroll, D. L., Vieira, S. M. C., Birkett, P. R. & Rego, C. A. *Applied Physics Letters* **81**, 2647–2649 (2002).
- Oudjedi, L. *Thèse : Méthodes d'absorption pour la microscopie de nano-objets individuels, Université de Bordeaux 1* (2012).
- Strano, M. S., Dyke, A., Usrey, M. L., Barone, P. W., Allen, M. J., Shan, H., Kittrell, C., Hauge, R. H., Tour, J. M. & Smalley, R. E. *Science* **301**, 1519–1522 (2003).
- Winzer, A. T., Kraft, C., Bhushan, S., Stepanenko, V. & Tessmer, I. *Ultramicroscopy* **121**, 8–15 (2012).

Chapitre III

Obtention de nanotubes de carbone ultracourts

1	Introduction.....	63
2	Système sels biliaires	63
2.1	Protocole de préparation des échantillons	63
2.2	Séparation par ultracentrifugation en gradient de densité.....	66
2.3	Caractérisation des échantillons	68
2.3.1	Microscopie à force atomique	68
2.3.2	Spectroscopie Raman	70
2.3.3	Spectroscopie d'absorption.....	72
2.4	Optimisation du rendement en nanotubes ultracourts	76
2.4.1	Variation des paramètres d'application des ultrasons.....	76
2.4.1.1	Caractérisations des échantillons	76
	• Microscopie à force atomique	76
	• Spectroscopie Raman	79
	• Spectroscopie d'absorption.....	80
2.4.2	Oxydation des nanotubes de carbone	81
2.4.2.1	Protocole de préparation des CNTs.....	81
2.4.2.2	Caractérisations.....	82
	• Analyse thermogravimétrique	82
	• Microscopie a force atomique	83
	• Spectroscopie Raman	86
	• Spectroscopie d'absorption.....	87
3	Système CTAB.....	89

3.1	Généralités	89
3.2	Protocole de préparation des échantillons	90
3.3	Caractérisations	91
3.3.1	Microscopie à force atomique	91
3.3.2	Spectroscopie Raman	92
3.3.3	Spectroscopie d'absorption.....	93
4	Bilan du chapitre III	95
5	Bibliographie	95

1 INTRODUCTION

Nous présentons dans ce chapitre les résultats portant sur l'obtention de nanotubes de carbone ultracourts. Au cours de ces travaux, différents tensioactifs ont été utilisés pour disperser les CNTs en solution aqueuse : les sels biliaires et le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), et sont regroupés dans deux systèmes distincts.

Les résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus avec des nanotubes de carbone « HiPCO » mono-paroi de chez Unidym (lot R1831). Ces nanotubes de carbone présentent des longueurs comprises entre 100 nm et quelques μm sous forme d'agrégats (**Figure III-1**).

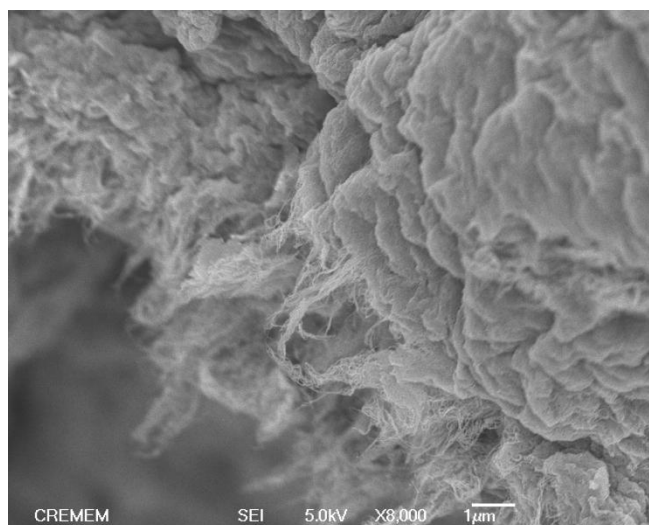


Figure III-1 : Cliché MEB de nanotubes de carbone HiPCO.

Il est donc nécessaire pour nos études de les désenchevêtrer et de raccourcir leur taille. Nous présentons dans la partie suivante le protocole employé pour obtenir et sélectionner des nanotubes de carbone ultracourts, ainsi que les différentes optimisations du procédé.

2 SYSTEME SELS BILIAIRES

2.1 PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le protocole que nous proposons consiste dans un premier temps à suspendre 30 mg de nanotubes bruts et 30 mg de sels biliaires dans un volume de 10 mL d'eau milliQ (0,3% CNTs/0,3% sels biliaires) à l'aide d'ultrasons. Les sels biliaires utilisés sont constitués d'un mélange de 50% de cholate de sodium et 50% de déoxycholate de sodium (Sigma-Aldrich No. 48305) (**Figure III-2**).

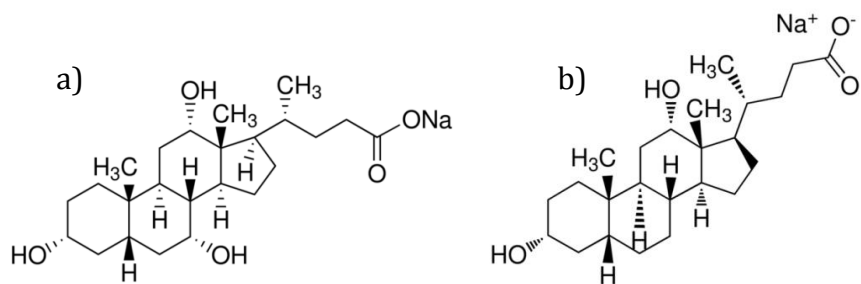


Figure III-2 : Structures chimiques a) du cholate de sodium et b) du déoxycholate de sodium, composants les sels biliaires.

Les ultrasons (US) sont appliqués aux dispersions à une puissance de 6W pendant 5h à l'aide d'une microsonde. Le protocole est décrit dans le **chapitre II p. 43**. La **Figure III-3** présente les dispersions avant et après application des US.

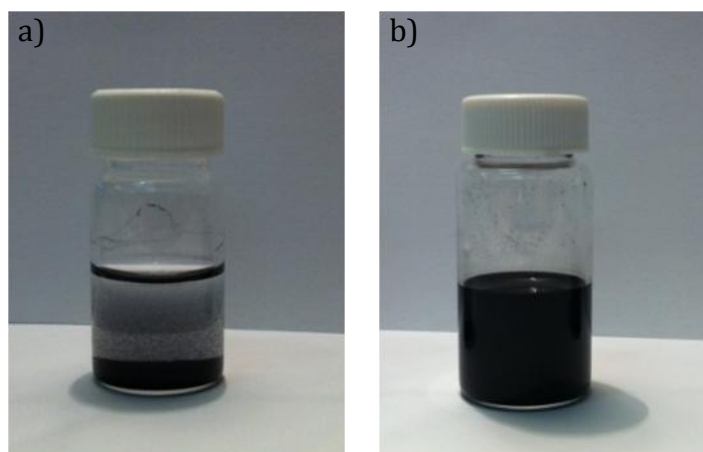


Figure III-3 : Clichés des dispersions de nanotubes de carbone a) avant et b) après sonication.

La dispersion de nanotubes est ensuite centrifugée à 2400 g dans une centrifugeuse de paillasse (« Sigma 2-6 ») pendant 30 min pour éliminer les agrégats et fagots de nanotubes non dispersés. Un contrôle est effectué par microscopie optique à l'aide d'un microscope Leica DM 2500P (**Figure III-4**).

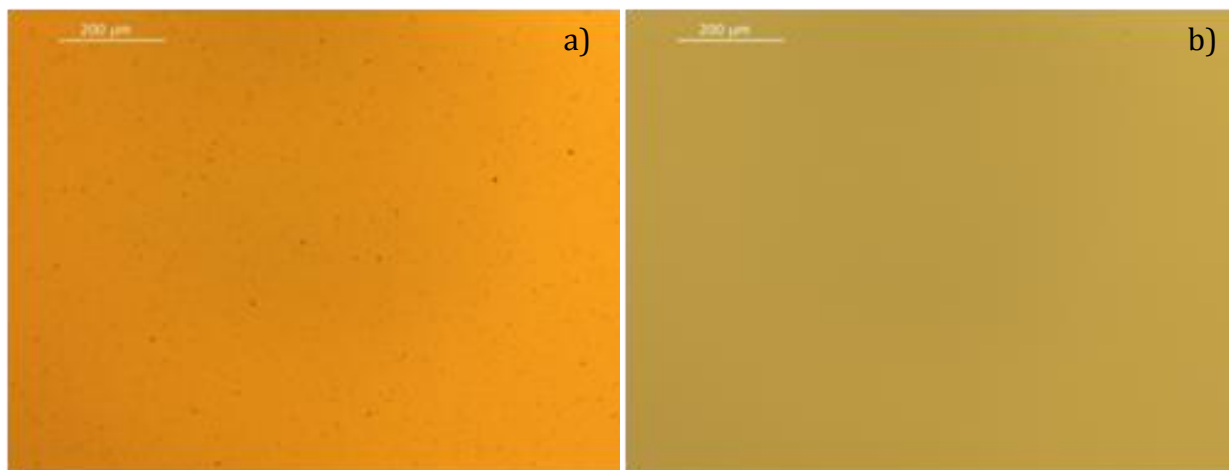


Figure III-4 : Clichés de microscopie optique de dispersions a) avant et b) après centrifugation. Ceci confirme l'absence d'agrégats de CNTs au sein de la dispersion après cette première centrifugation.

Le surnageant (≈ 9 mL) prélevé est alors composé de CNTs de longueurs différentes comme le montre le cliché TEM (**Figure III-5**).

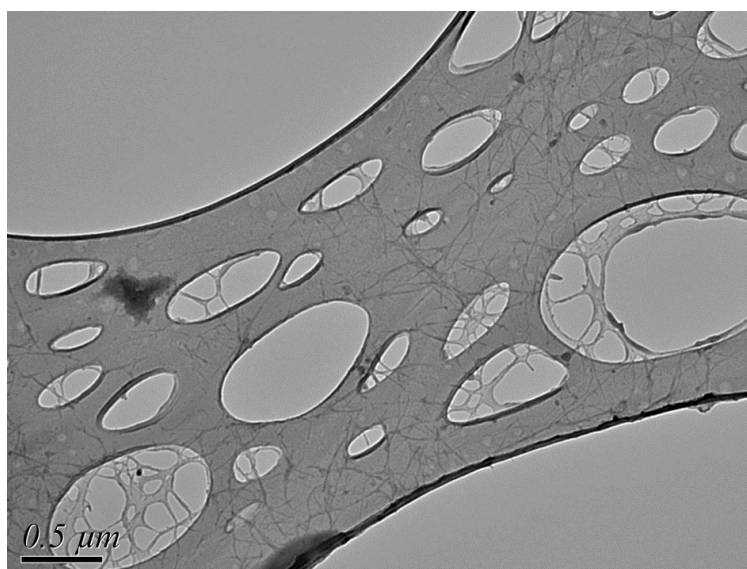


Figure III-5 : Cliché TEM de la dispersion après centrifugation.

Afin de réduire la polydispersité de la solution, il faut réaliser un premier tri à l'aide de l'ultracentrifugation. L'ultracentrifugation permet de faire tomber les CNTs les plus longs au fond du tube, ceux-ci n'étant pas conservés par la suite. Le surnageant est placé dans un tube à ultracentrifugation Beckman d'une capacité de 26,3 mL. Nous complétons le surnageant avec une solution aqueuse de sels biliaires à 0,3% en masse. Une ultracentrifugation de 3h à environ 244000 g à l'aide d'une centrifugeuse de type Sorvall WX Ultra 80 est appliquée et le surnageant obtenu est récupéré. Cette opération est répétée deux fois.

2.2 SEPARATION PAR ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITE

Nous avons choisi d'utiliser l'ultracentrifugation en gradient de densité pour séparer les CNTs selon leur longueur, à l'aide de la solution OptiPrep™ constituée à 60% de iodixanol dans l'eau et présentant une densité de $1,32 \text{ g.mL}^{-1}$ (**Figure III-6**). L'avantage d'employer cette molécule pour réaliser le gradient plutôt que la molécule de saccharose, par exemple, est que le iodixanol n'absorbe pas dans la gamme spectroscopique visible et proche infrarouge des nanotubes de carbone.

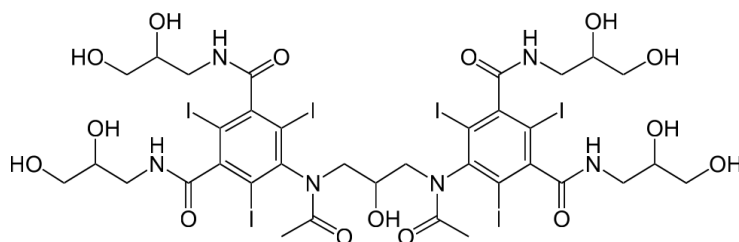


Figure III-6 : Structure chimique de la molécule de iodixanol.

Sun *et al.* appliquent également l'ultracentrifugation en gradient de densité pour séparer des CNTs dispersés par des PL-PEG selon leur longueur [Sun]. Le gradient de densité utilisé par ces auteurs, constitué de 3 couches de concentrations différentes en iodixanol (5%/7,5%/10%), est adapté à leurs dispersions, c'est-à-dire à leur tensioactif et il nous appartient de vérifier que ce même gradient peut convenir à la densité des nanotubes de nos dispersions pour un tri ultérieur.

Pour ce faire, nous réalisons donc la séparation isopycnique d'une dispersion de SWCNTs dispersés dans les sels biliaires à l'aide de la solution OptiPrep™. Le gradient de densité est constitué de plusieurs couches de solutions de différentes concentrations en iodixanol dilué dans de l'eau mQ (par ordre de dépôt : 35%/30%/25%/20%/15%/10%/5%). 2g d'une solution concentrée à $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ de SWCNTs sont déposés à la surface de ce gradient avant ultracentrifugation (**Figure III-7 a**). Une ultracentrifugation de 12h à 174000 g est appliquée et on récupère manuellement à l'aide de seringues équipées d'aiguilles recourbées des fractions de 1 mL de haut en bas (fractions A à S). La densité de chaque fraction est déterminée en pesant un volume connu (500 μL) à l'aide d'une micropipette et d'une balance électronique (**Figure III-7c**).

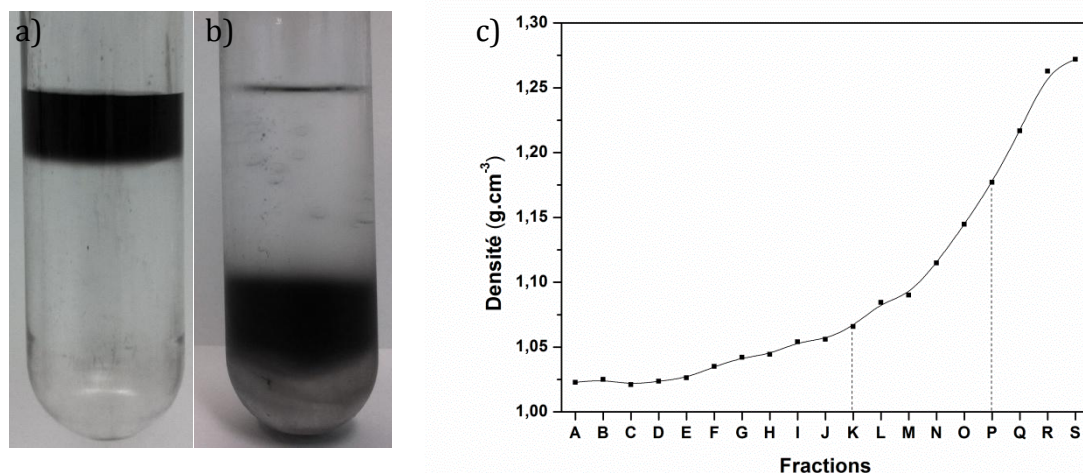


Figure III-7 : Séparation isopycnique de SWCNTs. Tubes de centrifugation de nanotubes dispersés dans les sels biliaires (174k g, 12h de centrifugation) a) avant et b) après séparation isopycnique. c) Gradient de densité isopycnique obtenu après séparation des nanotubes et pesée. La courbe est indiquée pour guider le lecteur. La fraction K est la première fraction contenant des CNTs. Les densités des fractions K à P sont moyennées pour avoir une estimation de la densité des SWCNTs dispersés avec des sels biliaires. Elle est de 1,11 g.cm⁻³.

La moyenne de densité, calculée sur les fractions contenant des nanotubes (K à P), de 1,11 g.cm⁻³ correspond à une densité d'environ 21% en iodixanol. Cette valeur est proche de celle déterminée par d'autres séparations isopycniques [Arnold, Sun]. Le gradient de densité utilisé pour séparer des SWCNTs-PL/PEG est donc adapté à notre étude sur des SWCNTs dispersés dans les sels biliaires.

Fort de ces vérifications, nous réalisons alors un gradient de densité constitué de 4 couches de iodixanol de concentrations 5%, 7,5%, 10% et 60%, contenant chacune 0,3% en masse de sels biliaires. Les couches sont ajoutées directement dans le tube d'ultracentrifugation de la plus dense à la moins dense. Dans un premier temps, 3,3 g de solution de iodixanol à 60% sont placés au fond du tube. Puis sont ajoutés 4,8 g de solution de iodixanol à 10% à l'aide d'une aiguille recourbée le long de la paroi afin de créer le minimum de perturbations, et de la même façon les solutions d'iodixanol à 7,5 % et 5%. Finalement nous ajoutons 3,3 g de la dispersion de nanotubes précédemment ultracentrifugée (0,25 mg.mL⁻¹) (**Figures III-8 a) et b)**).

Le tube est alors ultracentrifugé à 244000 g pendant 3h, puis nous récupérons différentes fractions nommées fractions A à O de 1 mL (**Figures III-8 c) et d)**).

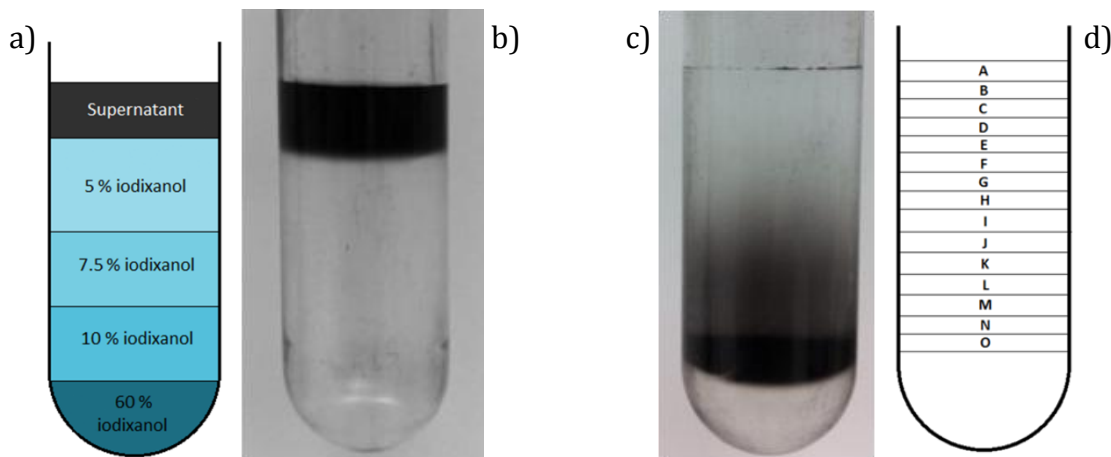


Figure III-8 : a) Schéma et b) cliché du tube d'ultracentrifugation avant DGU. c) Cliché et d) schéma du tube de centrifugation après DGU.

2.3 CARACTERISATION DES ECHANTILLONS

La caractérisation des échantillons de nanotubes courts s'est révélée être un défi majeur. Plusieurs techniques telles que la DLS et la microscopie électronique à transmission ne peuvent pas être utilisées pour déterminer la longueur de nos nanotubes avec précision.

Dans le cas de la DLS, les nanotubes les plus courts diffusent très faiblement la lumière. La polydispersité peut poser un problème : les nanotubes les plus longs « masquent » les plus courts. La présence d'impuretés ou d'agrégats est également visible, même en très petit nombre.

Les nanotubes de carbone ultracourts se sont également révélés être très difficilement détectables en microscopie électronique à transmission, même radiomarqués, du fait de leur faible contraste sur les grilles standard et de leur petite longueur.

Nous avons donc utilisé la combinaison de la microscopie à force atomique et de la spectroscopie optique (Raman et absorption) pour caractériser nos échantillons.

2.3.1 MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

Les échantillons, préparés selon le protocole du **chapitre II p. 51** à partir des différentes fractions, sont imagés par AFM. La **Figure III-9** présente les images AFM et les histogrammes des longueurs des nanotubes correspondants dans différentes fractions.

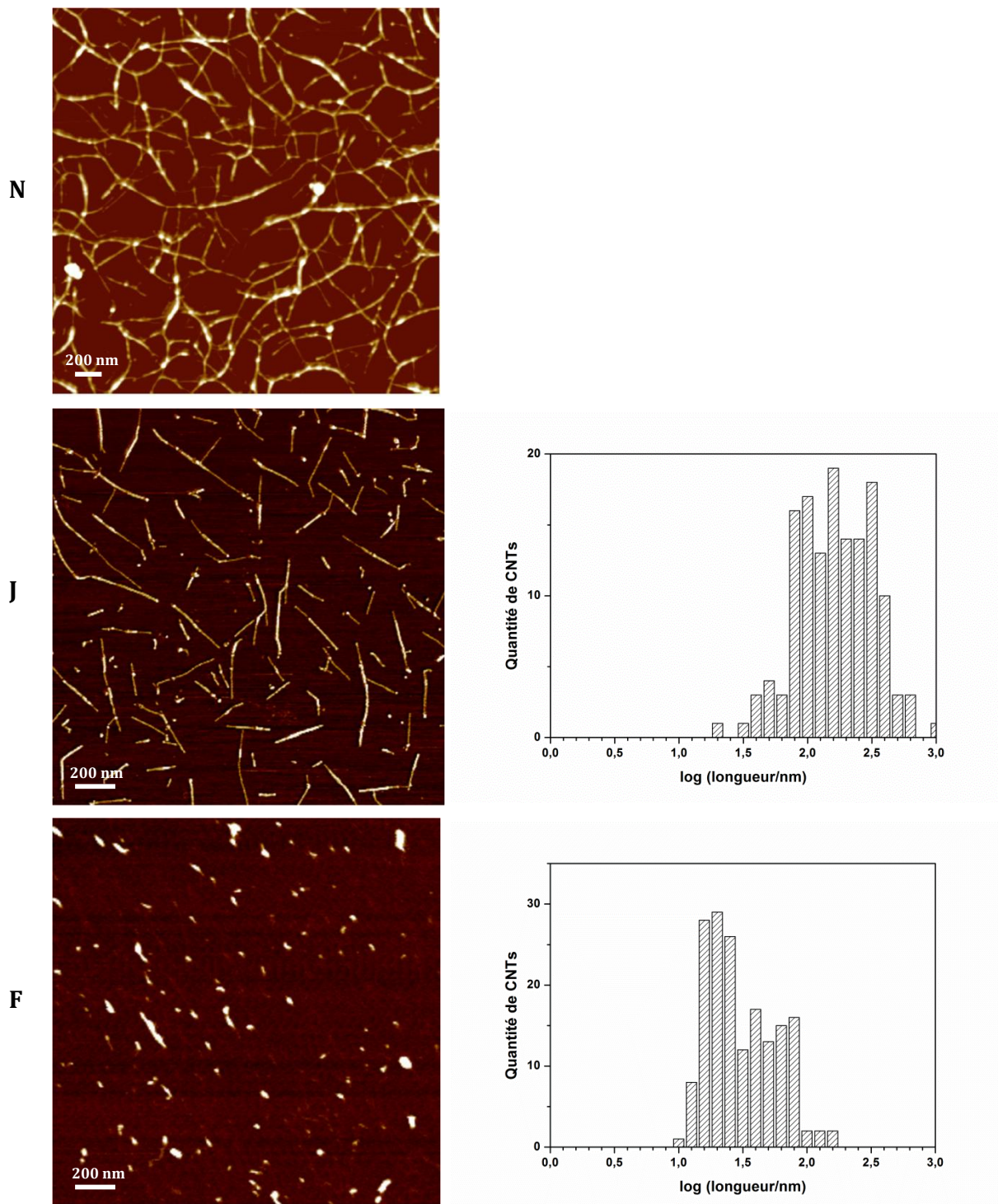


Figure III-9 : Images AFM de différentes fractions de nanotubes après l'étape de DGU. Les histogrammes des longueurs des nanotubes présents dans les fractions J et F sont présentés à côté du cliché AFM correspondant.

Les longueurs apparentes des nanotubes sont mesurées puis les valeurs obtenues sont corrigées selon la méthode décrite **p. 52** du **chapitre II**. Ainsi la longueur apparente des nanotubes est retranchée de $4\sqrt{r_{NT} \times (r - r_{NT})}$, avec $r_{NT} = 0,5 \text{ nm}$ et $r = 7 \text{ nm}$, soit 7,2 nm. Les mesures sont réalisées à l'aide du plugin NeuronJ de ImageJ.

Le **Tableau III-1** rassemble les statistiques sur les longueurs obtenues à partir des images AFM avec une dispersion relative de l'ordre de 70%.

Fraction	Moyenne (nm)	Médian (nm)	Min/Max (nm)
N	> 800	-	-
J	180 ± 127	146	20/814
F	34 ± 24	23	10/140

Tableau III-1 : Statistiques sur les longueurs des nanotubes présents dans les différentes fractions prélevées à l'issue de la DGU (évaluées par AFM après correction).

La fraction N, prélevée en bas du tube d'ultracentrifugation, présente les nanotubes les plus longs. Ces derniers sont organisés sous forme de réseau, ce qui rend difficile l'estimation de leur longueur. Toutefois, les quelques nanotubes mesurés ont une longueur supérieure à 800 nm, avec une majorité de nanotubes entre 1 µm et 2 µm.

La fraction intermédiaire J prélevée au milieu du tube d'ultracentrifugation présente des nanotubes faiblement tortueux d'une longueur de 180 nm en moyenne.

Les nanotubes les plus courts sont présents dans la fraction F qui a été prélevée vers le haut du tube d'ultracentrifugation. Ils présentent une longueur moyenne estimée de 34 nm, et environ 40% ont une longueur inférieure à 20 nm.

Il s'est avéré difficile de caractériser les fractions plus hautes en AFM, mais nous soupçonnons toutefois qu'elles contiennent des nanotubes bien plus courts (voir **p. 72** spectroscopie Raman et spectroscopie d'absorption).

2.3.2 SPECTROSCOPIE RAMAN

La spectroscopie Raman en solution présente l'avantage de pouvoir caractériser les nanotubes facilement et sans les endommager pour une utilisation ultérieure. Nous avons étudié dans un premier temps les fractions à 785 nm ($E = 1,58 \text{ eV}$). Les signaux des bandes RBM et des bandes D et G de quelques fractions sont présentés sur la **Figure III-10**.

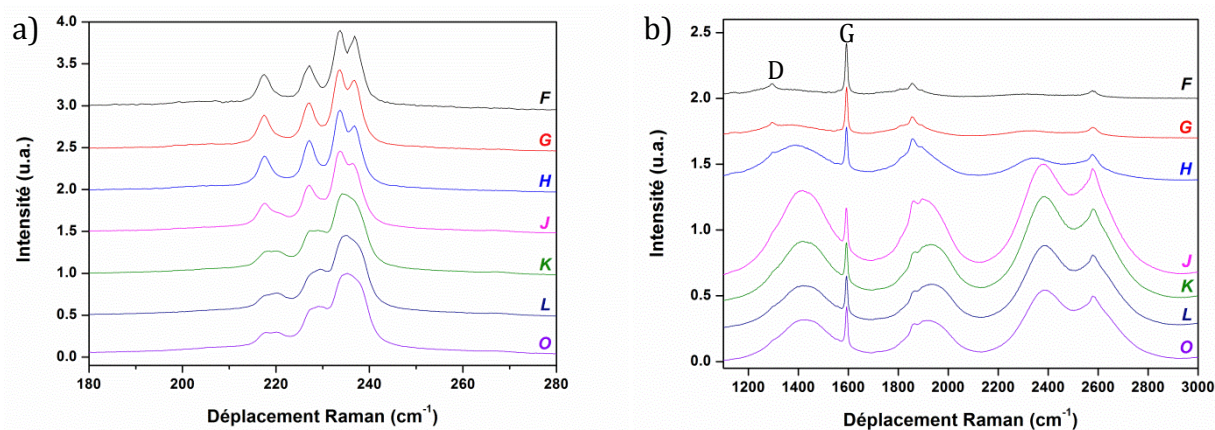


Figure III-10 : Spectres Raman à 785 nm normalisés a) des bandes RBM ; b) des bandes D et G des fractions après DGU.

Nous remarquons sur la **Figure III-10 a)** que les signaux RBM sont mieux résolus pour les fractions les plus hautes que pour les fractions les plus basses dans le tube de centrifugation. Ceci est peut-être dû à la présence de nanotubes agrégés ou sous forme de fagots dans les fractions les plus basses. La présence de RBM dans les fractions hautes confirme également que les objets observés sur les images AFM sont bien des nanotubes de carbone.

Les spectres Raman sur la **Figure III-10 b)** montrent une forte photoluminescence des nanotubes pour les fractions « intermédiaires » (J-K). Les nanotubes présents dans ces fractions sont relativement longs (180 nm) et individualisés, comme montré sur l'image AFM **p. 69**. Cette photoluminescence est plus faible pour les fractions basses (O) : quelques nanotubes sont agrégés ou en fagot. La photoluminescence décroît pour les fractions hautes (F, G et H) : les nanotubes sont individualisés et fortement raccourcis (longueur inférieure à 40 nm). Les CNTs ultracourts (fraction F) ne photoluminescent plus. La perte de photoluminescence est donc une première indication du fort raccourcissement des tubes.

L'étude de l'évolution du rapport I_D/I_G peut être également un indicateur du raccourcissement des nanotubes. En considérant que la paroi des nanotubes est exempte de défauts structuraux et que seules leurs extrémités en comportent [Chou], une augmentation de ce rapport indique une diminution de la longueur des nanotubes. En effet, plus la longueur du nanotube est faible, plus la contribution des carbones sp^3 au bout des tubes augmente relativement à celle des carbones sp^2 le long des tubes, et donc plus le rapport I_D/I_G augmente.

La présence de photoluminescence sur les spectres Raman à 785 nm rendant difficile l'observation des bandes D et G, et donc l'évaluation du rapport I_D/I_G , les fractions ont été analysées à l'aide du laser rouge 638 nm ($E = 1,94$ eV) (**Figure III-11**).

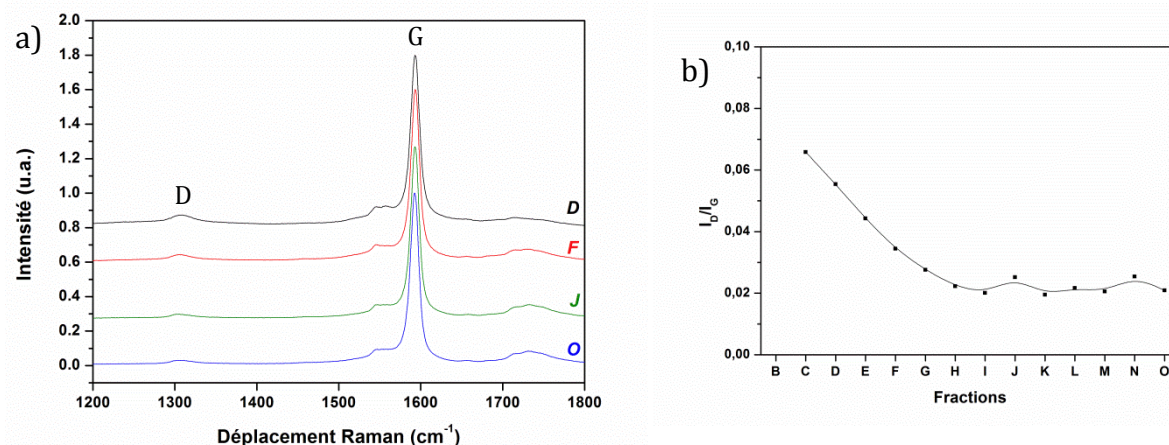


Figure III-11 : a) Spectres Raman à 638 nm des bandes D et G de quatre fractions (D, F, J et O) ; b) Evolution du rapport I_D/I_G en fonction des fractions (la courbe est indiquée pour guider le lecteur).

Nous remarquons que la bande D est sensiblement plus intense dans le cas des fractions hautes comparé aux fractions basses (**Figure III-11 a**). En effectuant le rapport des intensités des bandes D et G (I_D/I_G) après normalisation et correction des lignes de base, nous constatons que celui-ci augmente lorsque l'on se déplace dans le sens inverse du gradient de densité, et n'évolue plus de la fraction H jusqu'à la fraction O (**Figure III-11 b**). L'augmentation de ce rapport est le signe du raccourcissement des CNTs pour les fractions les plus hautes du tube d'ultracentrifugation.

2.3.3 SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION

Les spectres d'absorption des fractions prélevées après DGU sont présentés sur la **Figure III-12**. Les pics indiqués correspondent aux résonances S_{11} des différentes chiralités présentes dans l'échantillon.

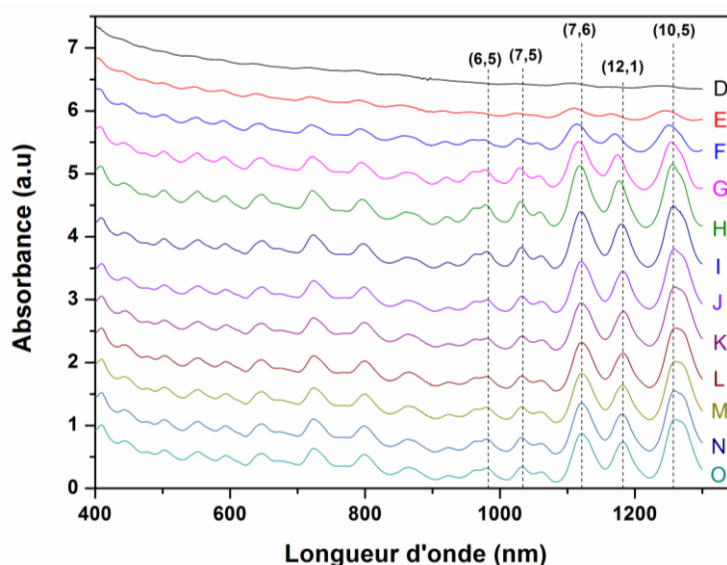


Figure III-12 : Spectres d'absorption des différentes fractions de nanotubes après DGU et prélèvement. Quelques chiralités pour des CNTs semiconducteurs sont présentées.

Les fractions les plus hautes (A-C) n'ont pas de signaux d'absorbance suffisamment intenses pour être exploitées, c'est pourquoi ils ne sont pas présentés ici. La **Figure III-12** montre un décalage vers le bleu des pics des fractions basses aux fractions les plus hautes du tube d'ultracentrifugation. Ce décalage est d'autant plus marqué que la fraction est haute. Ce phénomène est lié au confinement quantique des excitons le long de l'axe du nanotube. Ces excitons présentent des variations d'énergie bien définies données par la résolution de l'équation de Schrödinger [Oudjedi] :

$$\Delta E = \frac{\hbar^2 k_z^2}{2m^*} = \left(\frac{\hbar^2}{2m^*} \right) \left(\frac{\pi^2}{L^2} \right) \quad \text{Equation III-1}$$

Avec \hbar la constante réduite de Planck, k_z le vecteur d'onde le long de l'axe du nanotube tel que $k_z = \frac{\pi}{L}$, m^* la masse réduite de l'exciton et L la longueur du nanotube.

La **Figure III-13** présente l'évolution théorique de la variation des énergies de transition en fonction de la longueur des nanotubes en considérant une masse réduite de l'exciton $m^* = 0,05 m_0$, avec m_0 la masse de l'électron [Wang].

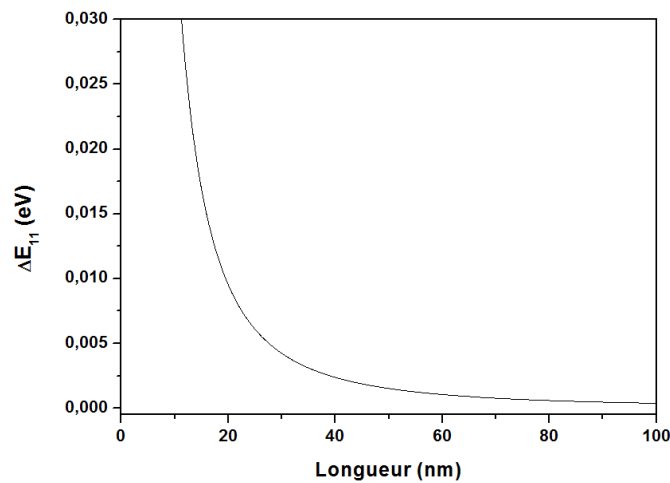


Figure III-13 : Décalage spectral théorique d'après l'équation III-1 pour une masse réduite de l'exciton $m^* = 0,05 m_0$.

La variation des énergies de transition ΔE_{11} est d'autant plus importante que la longueur du nanotube diminue. Les nanotubes courts présentent donc un décalage de leurs raies d'absorption vers les hautes longueurs d'onde fortement marqué. Cette variation devient très faible à partir d'une certaine longueur de nanotubes. Il faut choisir la fraction basse du tube d'ultracentrifugation où les CNTs sont les plus longs pour référence.

Les décalages spectraux pour les chiralités semiconductrices indiquées sur la **Figure III-12** sont calculés à partir de la quantification de l'énergie des excitons :

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equation III-2}$$

avec h la constante de Planck, c la célérité de la lumière et λ la longueur d'onde en m.

En simplifiant :

$$\Delta E = \frac{1240}{\lambda_o} - \frac{1240}{\lambda_i} \quad \text{Equation III-3}$$

où λ_o correspond à la longueur d'onde associée à une chiralité de la fraction 0 utilisée comme référence et λ_i la longueur d'onde associée à cette même chiralité pour les autres fractions ($i = N \rightarrow D$)

Ainsi la variation des énergies de transition est estimée pour chaque chiralité (**Figure III-14**).

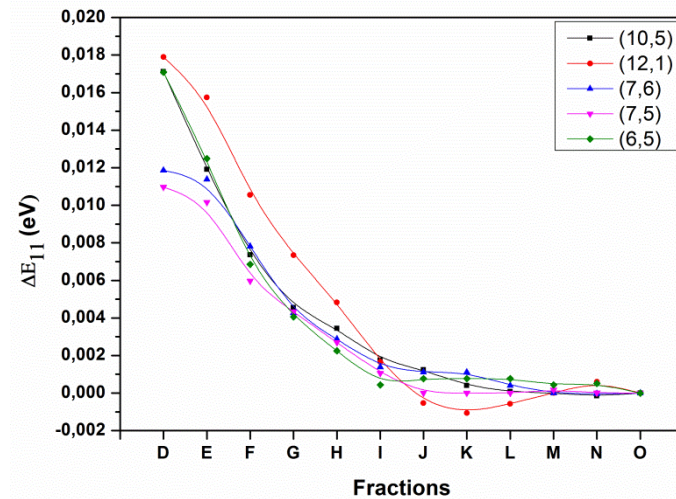


Figure III-14 : Décalages spectraux pour cinq chiralités semiconductrices. Les courbes ne sont pas des modélisations mathématiques et sont indiquées pour guider le lecteur.

Les décalages spectraux ΔE_{11} déterminés pour chaque chiralité sont plus importants pour les fractions les plus hautes du tube d'ultracentrifugation après DGU. C'est bien dans ces fractions que sont retrouvés les nanotubes les plus courts. Il est également observé une stagnation de la variation des énergies de transition à partir de la fraction J, cohérent avec le fait que cette variation devient très faible à partir d'une certaine longueur de nanotubes.

Les longueurs théoriques des nanotubes, estimées à partir des décalages spectraux de la **Figure III-14** précédente et de l'**équation III-3**, pour les fractions les plus hautes du tube d'ultracentrifugation sont listées dans le **Tableau III-2**.

Fraction	Longueur estimée (nm)
D	14 - 19
E	15 - 20
F	19 - 25
G	23 - 31
H	38 - 41

Tableau III-2 : Tableau des longueurs théoriques des CNTs après DGU pour les fractions les plus hautes.

Les longueurs théoriques estimées pour les fractions les plus hautes sont en dessous de 20 nm, et traduisent le tri des nanotubes grâce au processus de DGU.

Un tri des nanotubes selon leur chiralité est également observé (**Annexe III p. 120**).

La spectroscopie d'absorption permet également de quantifier la concentration en nanotubes de carbone au sein de chaque fraction après DGU. La **Figure III-15** montre les quantités de CNTs pour chaque fraction.

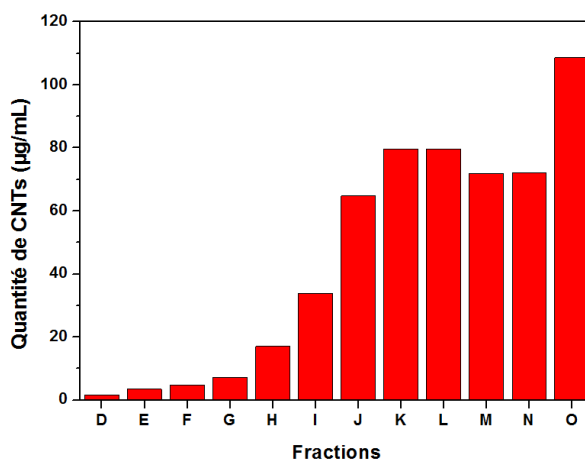


Figure III-15 : Histogramme des quantités de CNTs pour chaque fraction après DGU.

Les fractions les plus basses du tube à ultracentrifugation sont les fractions les plus concentrées en nanotubes. Les quantités de CNTs ultracourts obtenus après DGU, déterminées à partir d'une gamme étalon, sont faibles : $1,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la fraction D, $3,46 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la fraction E et $4,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la fraction F. Ces valeurs ne peuvent être

comparées aux données de la littérature car les auteurs travaillant sur l'obtention de tubes ultracourts n'indiquent pas de concentration.

Afin d'augmenter la concentration en nanotubes ultracourts au sein des dispersions, nous avons envisagé d'augmenter la puissance et le temps de sonication, ou d'oxyder préalablement les nanotubes.

2.4 OPTIMISATION DU RENDEMENT EN NANOTUBES ULTRACOURTS

2.4.1 VARIATION DES PARAMETRES D'APPLICATION DES ULTRASONS

Afin d'augmenter la quantité de nanotubes ultracourts au sein de nos dispersions, nous avons choisi de modifier légèrement le protocole de sonication, en appliquant des puissances et/ou des temps d'application d'US plus élevés. Nous réalisons trois dispersions de CNTs avec des puissances et temps d'ultrasons de :

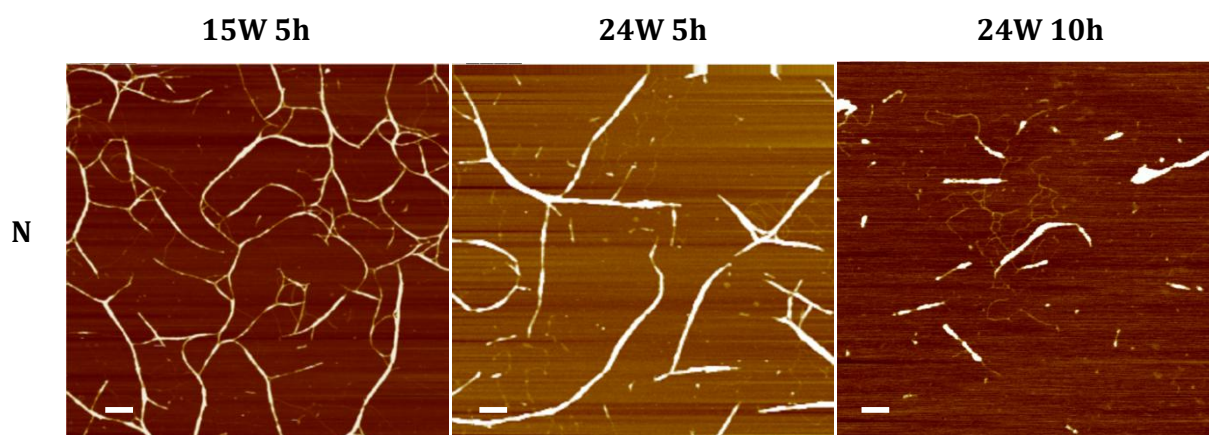
- $P_{US} = 15W$; $T_{US} = 5h$
- $P_{US} = 24W$; $T_{US} = 5h$
- $P_{US} = 24W$; $T_{US} = 10h$

Les protocoles d'ultracentrifugation et de DGU restent les mêmes.

2.4.1.1 CARACTERISATIONS DES ECHANTILLONS

- MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

La **Figure III-16** présente les images AFM des nanotubes dans différentes fractions après DGU.



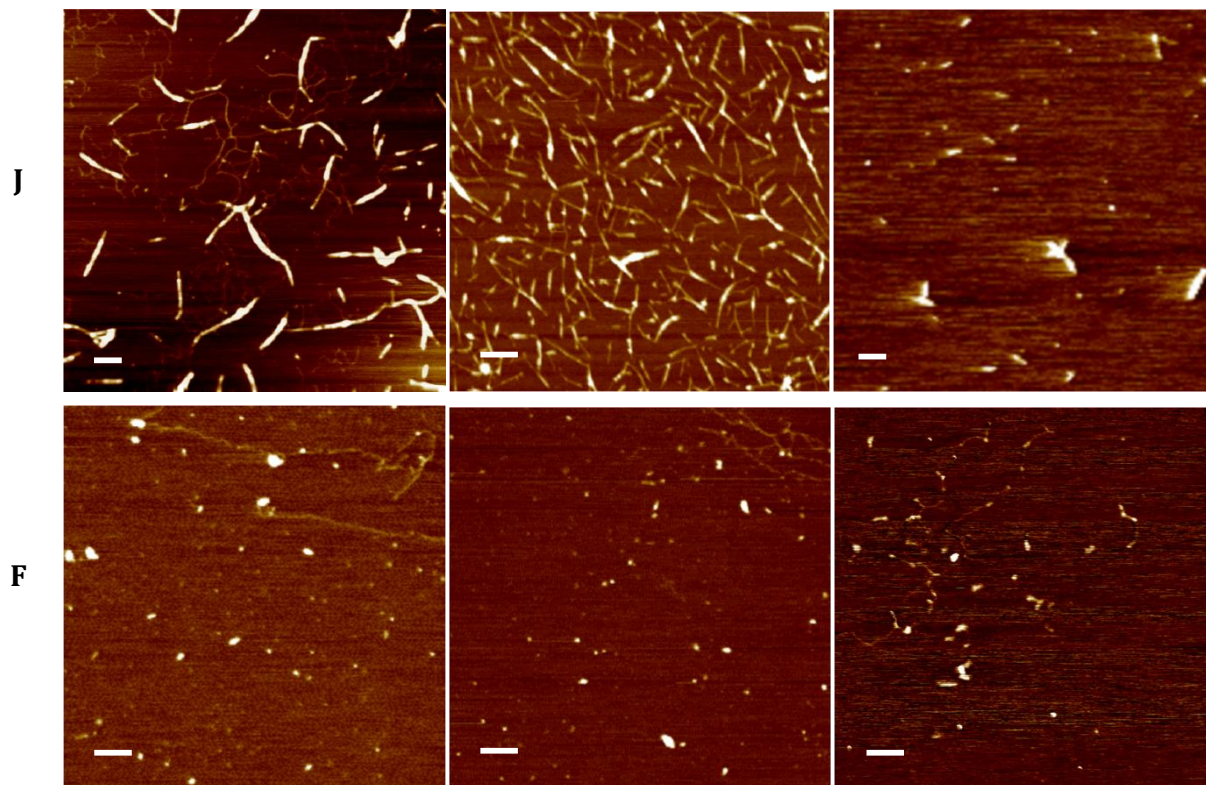


Figure III-16 : Images AFM de différentes fractions de nanotubes après l'étape de DGU pour trois conditions de sonication. La barre des échelles est de 200 nm.

La **Figure III-17** présente les histogrammes des longueurs déterminées à partir des images AFM pour les trois conditions d'application des ultrasons.

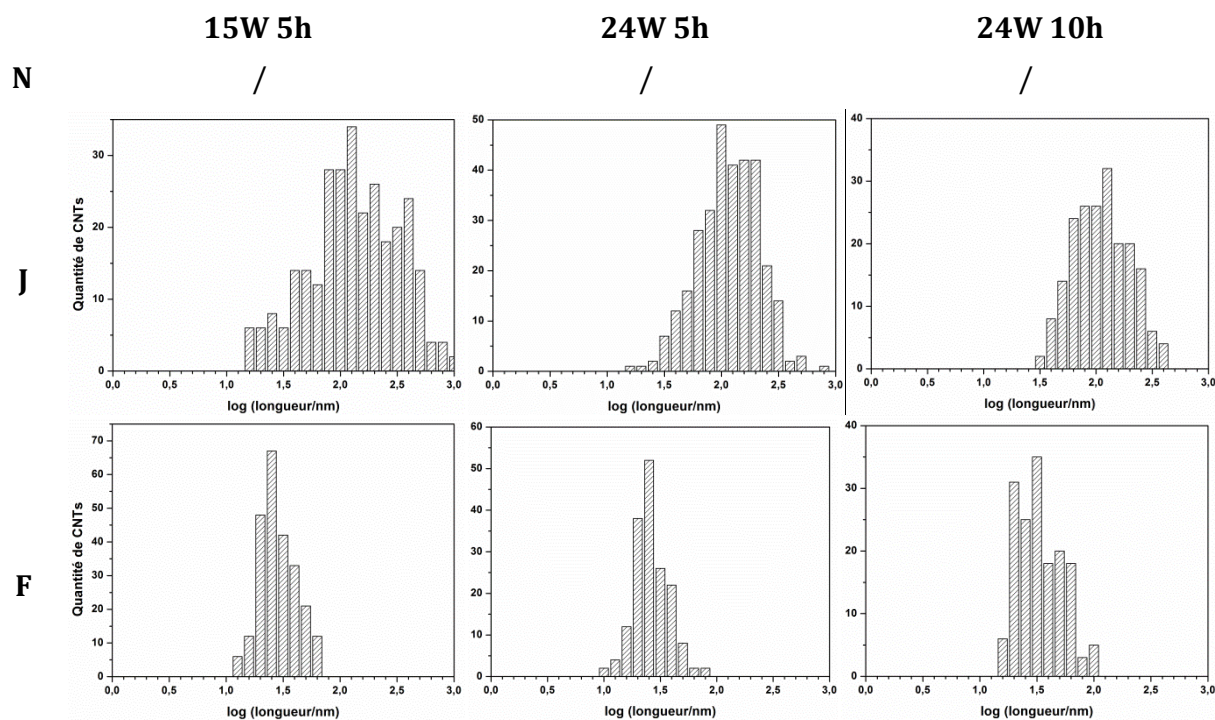


Figure III-17 : Histogrammes des longueurs des CNTs pour trois conditions de sonication.

Les CNTs présents dans les fractions N sont trop longs pour être mesurés de manière fiable. Cette figure indique cependant la reproductibilité du tri des CNTs avec le procédé de DGU, pour les fractions présentant des nanotubes de carbone courts et ultracourts (J et F) : les longueurs estimées sont sensiblement les mêmes pour les nanotubes de carbone.

Le **Tableau III-3** rassemble les statistiques sur les longueurs obtenues à partir des images AFM pour les trois conditions d'application des ultrasons.

		N	J	F
15W 5h	Moyenne	>1000	169 ± 150	27 ± 11
	Médian	-	115	23
	Min/Max	-	15/843	11/63
24W 5h	Moyenne	> 1000	121 ± 80	25 ± 10
	Médian	-	102	22
	Min/Max	-	13/699	10/67
24W 10h	Moyenne	-	114 ± 68	33 ± 19
	Médian	-	98	27
	Min/Max	-	27/333	13/96

Tableau III-3 : Statistiques sur les longueurs des nanotubes présents dans les différentes fractions prélevées à l'issue de la DGU (évaluées par AFM après correction).

La **Figure III-18** montre la longueur des CNTs en fonction des conditions d'application des US utilisées pour disperser et raccourcir les nanotubes.

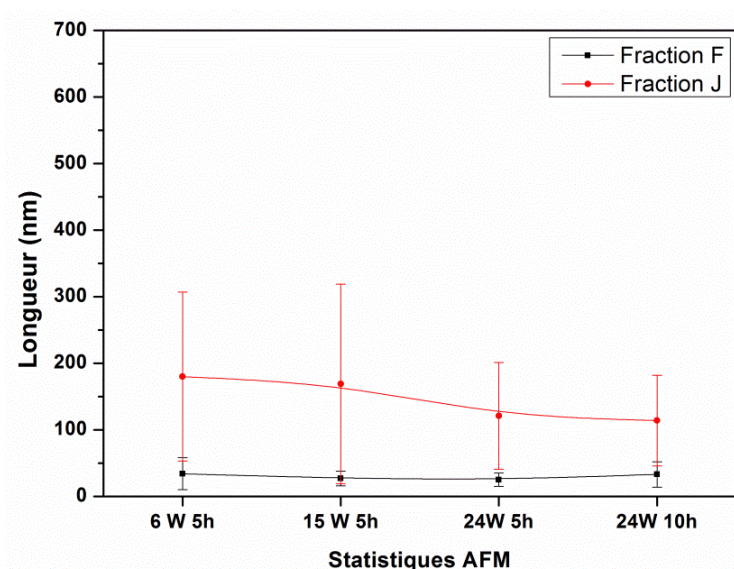


Figure III-18 : Comparaison des longueurs déterminées par AFM des CNTs en fonction des conditions expérimentales (puissance et temps d'application des ultrasons) pour les fractions F (en noir) et J (en rouge).

Il n'y a pas de différences significatives pour les longueurs des nanotubes des fractions F et J selon les différentes conditions de dispersion et scission des CNTs. Les gammes de longueur des CNTs sont les mêmes pour ces fractions, confirmant la reproductibilité du tri par le processus de DGU.

- SPECTROSCOPIE RAMAN

Les surnageants des quatre dispersions de nanotubes dans les sels biliaires sont analysés par spectroscopie Raman à 638 nm (**Figure III-19**).

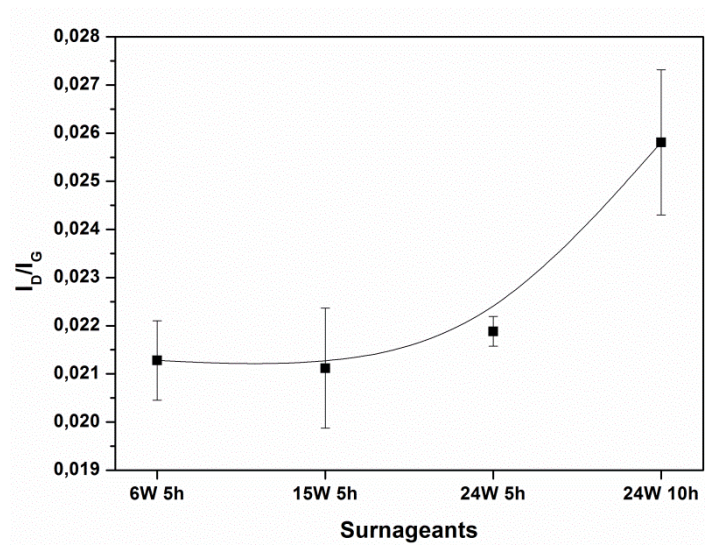


Figure III-19 : Comparaison des rapports I_D/I_G des surnageants centrifugés avant DGU. Ces mesures ont été réalisées trois fois. La courbe est indiquée pour guider le lecteur.

Bien que l'évolution du rapport I_D/I_G ne soit pas significative étant donné les barres d'erreurs présentées, ce dernier tend malgré tout à croître légèrement avec une augmentation des puissances et des temps de sonication. Cette tendance peut être attribuée à l'augmentation de la présence de défauts induit par le processus de sonication. Une puissance de 24 W conjuguée à une application des ultrasons pendant 10 h confère une énergie acoustique plus intense au système, conduisant à une scission des nanotubes plus forte.

Les rapports I_D/I_G des différentes fractions récupérées après le processus de DGU pour les différentes dispersions sont comparés sur la **Figure III-20**.

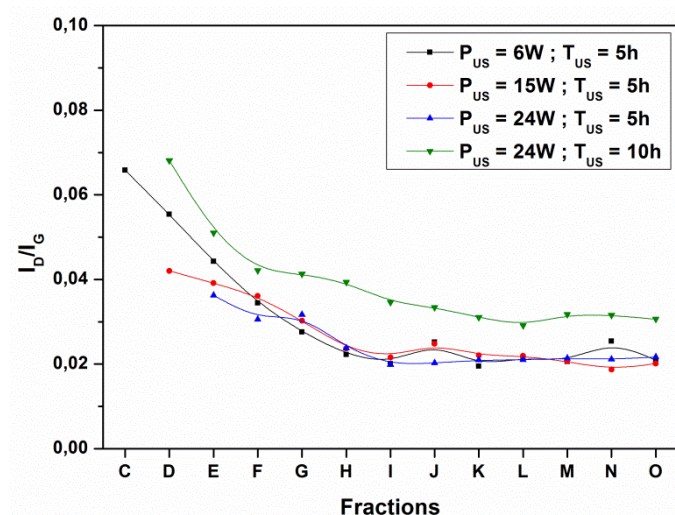


Figure III-20 : Evolution des rapports I_D/I_G en fonction des fractions après DGU pour les quatre conditions d'application des ultrasons (les courbes sont indiquées pour guider le lecteur).

Il est constaté une superposition des profils des rapports I_D/I_G pour les trois conditions de d'application des US pour une durée de 5h. Les fractions hautes du tube d'ultracentrifugation (C-G) présentent les mêmes rapports I_D/I_G à peu de chose près, indiquant que les CNTs de ces fractions présentent à priori les mêmes longueurs, signe de reproductibilité du tri des CNTs par DGU.

La puissance d'application des US ne semble donc pas jouer un rôle prépondérant à notre niveau. Néanmoins nous remarquons que ce ratio est de 0,034 pour une puissance de 24 W associée à un temps de sonication de 10h contre 0,022 en moyenne au niveau des fractions basses pour les autres DGU. Nous attribuons cette augmentation à l'introduction d'un plus grand nombre de défauts au niveau de la paroi des nanotubes par l'application d'une énergie acoustique plus importante à la dispersion pour une sonication de 10 h à une puissance de 24W.

- SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION

Le tri des nanotubes par DGU étant effectué dans les mêmes conditions expérimentales (mêmes gradients en iodixanol), il est possible de déterminer et comparer le pourcentage de CNTs obtenus en fonction des puissances et temps d'US utilisés.

La **Figure III-21** montre les quantités de CNTs présentes dans chaque fraction après DGU pour les différentes conditions de sonication.

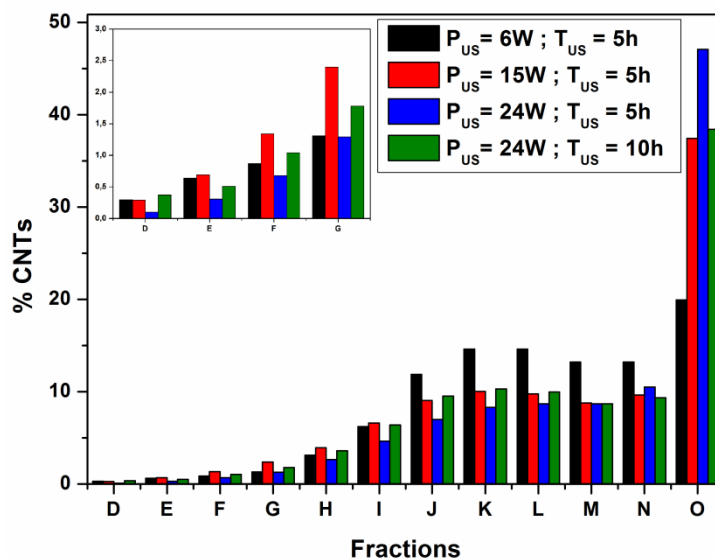


Figure III-21 : Comparaison du pourcentage de CNTs bruts stabilisés par des sels biliaires par fraction entre les différentes DGU. Un zoom sur les fractions contenant les nanotubes les plus courts est indiqué sur la figure.

Il n'y a pas d'évolution significative du pourcentage de CNTs selon la puissance ou le temps de sonication. Les quantités de CNTs obtenus après DGU pour chaque fraction sont sensiblement les mêmes selon le temps et la puissance d'US considérés. Il semble que nous n'obtenions pas plus de nanotubes courts dans les fractions hautes en appliquant des P_{US} et T_{US} plus importants.

2.4.2 OXYDATION DES NANOTUBES DE CARBONE

L'oxydation permet d'éliminer les catalyseurs métalliques à l'intérieur des CNTs par ouverture de ces derniers. Elle permet également de créer des fonctions organiques (alcooliques, cétoniques, carboxyliques...) à la surface des CNTs. L'intérêt de cette fonctionnalisation est d'augmenter leur solubilité et donc leur dispersion en milieux aqueux. Elle permet aussi d'induire des défauts à la surface des CNTs, facilitant leur scission en CNTs plus courts.

2.4.2.1 PROTOCOLE DE PREPARATION DES CNTs

Les nanotubes bruts sont oxydés par l'acide nitrique (HNO_3) concentré à 3,6 M dans l'eau pendant 8h au reflux à 125°C sous agitation magnétique (**Figure III-22**). Nous nous sommes limités à 8h de réaction pour ne pas perdre trop de matière, les CNTs se dégradant par l'oxydation.

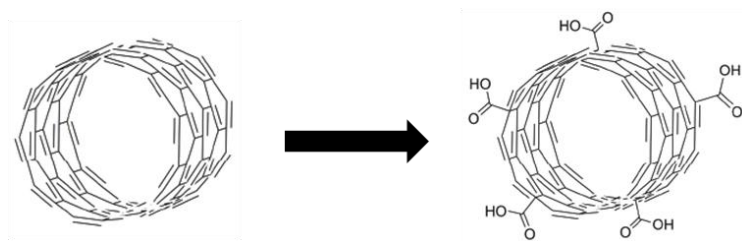


Figure III-22 : Représentation schématique des nanotubes de carbone avant et après oxydation à l'acide nitrique.

Le mélange est ensuite filtré sur une membrane PVDF hydrophile (porosité 0,22 μm), puis lavé par la soude (NaOH) concentrée à 2M afin d'éliminer le carbone amorphe et autres CCFs. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le filtrat ne soit plus coloré. Il s'ensuit plusieurs lavages à l'eau distillée dans le but de neutraliser la base et de ramener la solution au pH de l'eau de lavage. Les CNTs sont ensuite maintenus sous la forme d'une poudre humide avant utilisation.

Des essais de dispersion dans l'eau ont été effectués sans tensioactifs. Il s'avère que dans ces conditions d'oxydation (8h d'oxydation au reflux) les CNTs ne sont pas suffisamment solubles dans l'eau pour s'affranchir de l'utilisation d'un tensioactif. Nous choisissons d'assister la dispersion à l'aide de sels biliaires avec les mêmes concentrations que notre protocole défini **p. 63**. Le temps d'application des US est de 5h et la puissance est fixée à 24W. Les conditions de centrifugation sont les mêmes que celles présentées précédemment.

2.4.2.2 CARACTERISATIONS

- ANALYSE THERMOGRAVIMETRIQUE

L'ATG fournit des renseignements sur la quantité de fonctions acide carboxylique (COOH) présentes à la surface des nanotubes de carbone. Il est alors possible d'estimer le nombre de fonctions COOH.

La **Figure III-23** compare les spectres ATG obtenus sous flux d'argon de nanotubes bruts et de nanotubes oxydés.

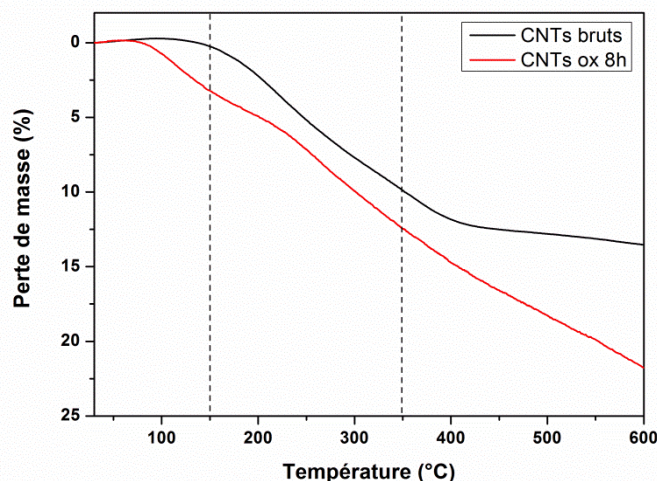


Figure III-23 : Spectres des ATG sous argon pour les nanotubes bruts et les nanotubes oxydés 8h à l'aide de l'acide nitrique.

Les nanotubes bruts présentent une perte de masse en ATG sous argon, reflet de la présence d'un certain nombre de fonctions organiques à leur surface. Ces fonctions organiques correspondent à des groupements carboxyliques pour une perte de masse entre 150°C et 350°C [Datsyuk]. Il est alors possible de calculer le taux de fonctions COOH présentes à la surface des nanotubes bruts et oxydés et de déterminer le taux de fonction apporté par un traitement à l'acide nitrique pendant 8h. Le détail des calculs est expliqué en **Annexe II p. 118** :

La perte de masse W_0 entre 150°C et 350°C pour les nanotubes bruts est de 9,23%. Les nanotubes bruts présentent donc 2,71 groupements carboxyliques pour 100 atomes de carbone, ce qui représente une fonction COOH tous les 14 cycles.

La perte de masse W_1 entre 150°C et 350°C pour les nanotubes oxydés 8h est de 12,88 %. Les nanotubes de carbone oxydés présentent environ 4 groupements carboxyliques pour 100 atomes de carbone, ce qui correspond à une fonction COOH tous les 9-10 cycles carbonés.

- MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

La **Figure III-24** présente les clichés AFM obtenus sur des fractions de nanotubes oxydés après DGU.

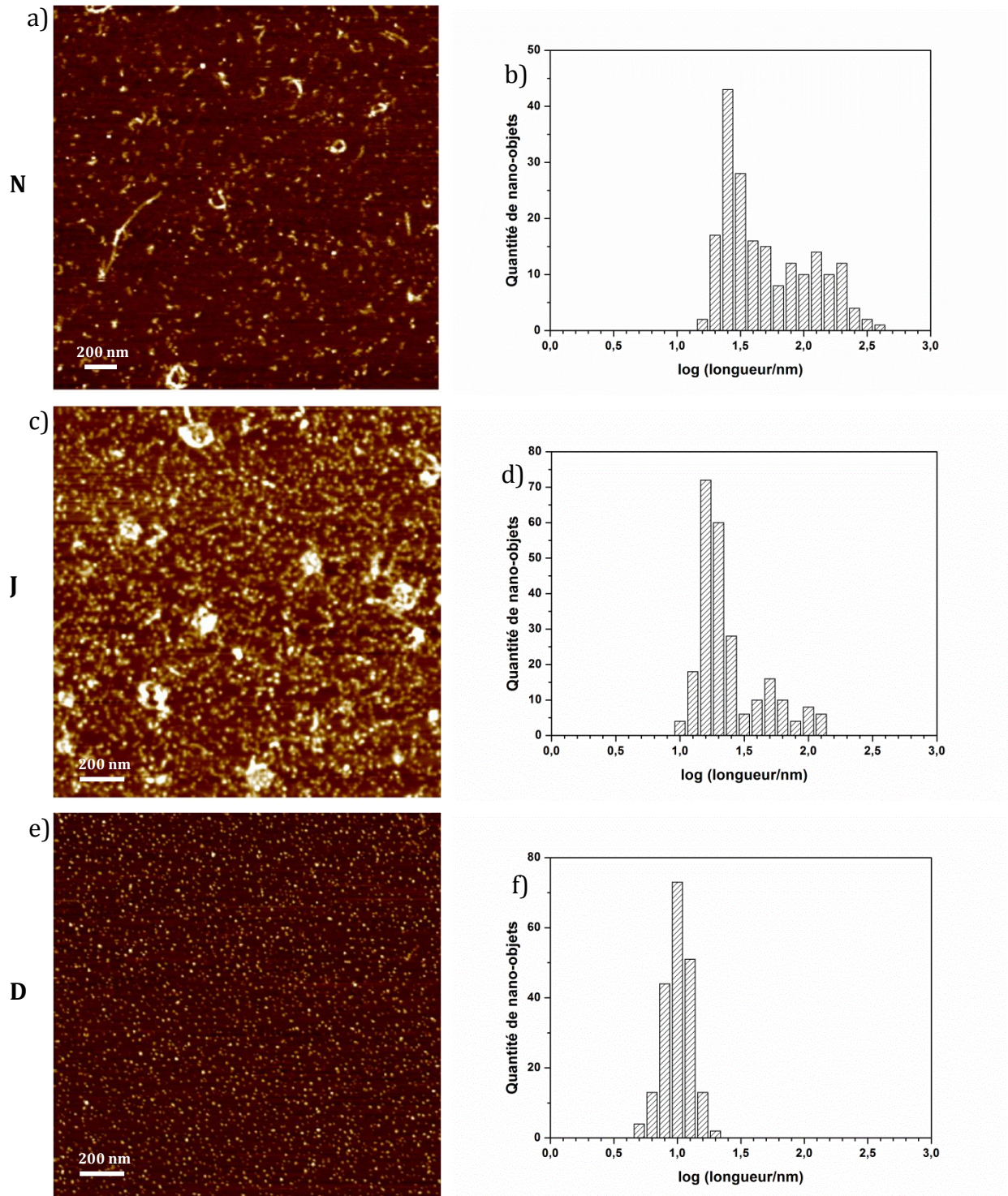


Figure III-24 : Images AFM et histogrammes de différentes fractions de nanotubes oxydés (N, J et D) après l'étape de DGU.

Le **Tableau III-4** rassemble les statistiques sur les longueurs obtenues à partir des images AFM.

Fraction	Moyenne (nm)	Médian (nm)	Min/Max (nm)
N	65 ± 63	34	15/354
J	27 ± 22	19	9/119
D	9 ± 2	9	4/18

Tableau III-4 : Statistiques sur les longueurs des nano-objets présents dans les différentes fractions prélevées à l'issue de la DGU (évaluées par AFM après correction).

Les clichés AFM montrent la forte dégradation des nanotubes suite au traitement oxydant et à la sonication. Les fractions basses (Fraction N) présentent quelques CNTs longs (**Figure III-24 a**) mais en nombre beaucoup moins important que les fractions basses des CNTs bruts. Il est également constaté la présence de deux populations de nano-objets dont les tailles moyennes sont de 27 et 116 nm (**Figure III-24 b**).

Le cliché AFM de la fraction J montre également la présence de deux populations de nano-objets de 18 et 56 nm (**Figure III-24 d**). Nous notons également la présence de nanotubes agrégés.

Le cliché AFM de la fraction D (**Figure III-24 e**) montre un mélange constitué de nanotubes courts, mais également de nano-objets, dans des proportions de 70%/30%. Ces derniers présentent une taille inférieure à 20 nm et possèdent une hauteur de 0,4 - 0,5 nm, ce qui correspond à la hauteur d'un feuillet de graphène. Ces objets pourraient être des nano-GO.

Des études sous lampe UV à 365 nm montrent une fluorescence jaune des nano-objets contenus dans les fractions hautes après DGU (**Figure III-25**).

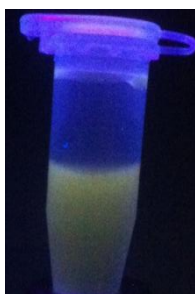


Figure III-25 : Cliché de la fraction D des nanotubes oxydés illuminée sous une lampe UV-Visible (385 nm).

Cette fluorescence n'est pas observée pour les fractions basses après le processus de DGU.

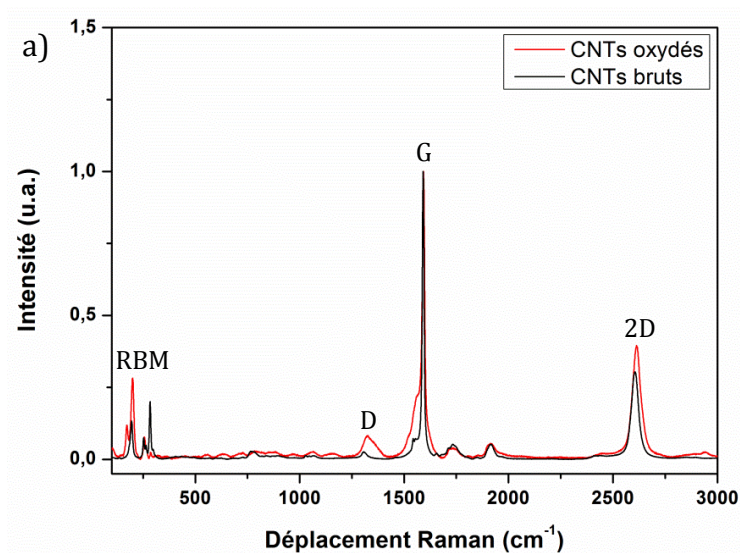
Ces propriétés de fluorescence sont montrées pour des nano-GO synthétisés à partir de charbon dans des travaux récents de l'équipe de James Tour de Rice [Ye].

De tels nano-objets, de part leurs propriétés de photoluminescence, pourraient être utilisés comme nano-marqueur pour des applications de bioimagerie ou biomédicales. Les nano-GO ont également l'avantage de posséder des propriétés optiques stables dans le temps, de ne pas être soumis au photoblanchiment, contrairement à d'autres sondes organiques fluorescentes, et d'être solubles en milieux aqueux.

L'association du traitement à l'acide nitrique et d'une sonication intense permet donc de couper les CNTs aussi bien transversalement que longitudinalement.

- SPECTROSCOPIE RAMAN

La **Figure III-26** montre la comparaison de deux spectres Raman à 638 nm obtenus sur les surnageants avant DGU de nanotubes bruts et de nanotubes oxydés dispersés dans les sels biliaries à une puissance de 24W pendant 5h. Les lignes de base ont été corrigées et les intensités ont été normalisées par la bande G.



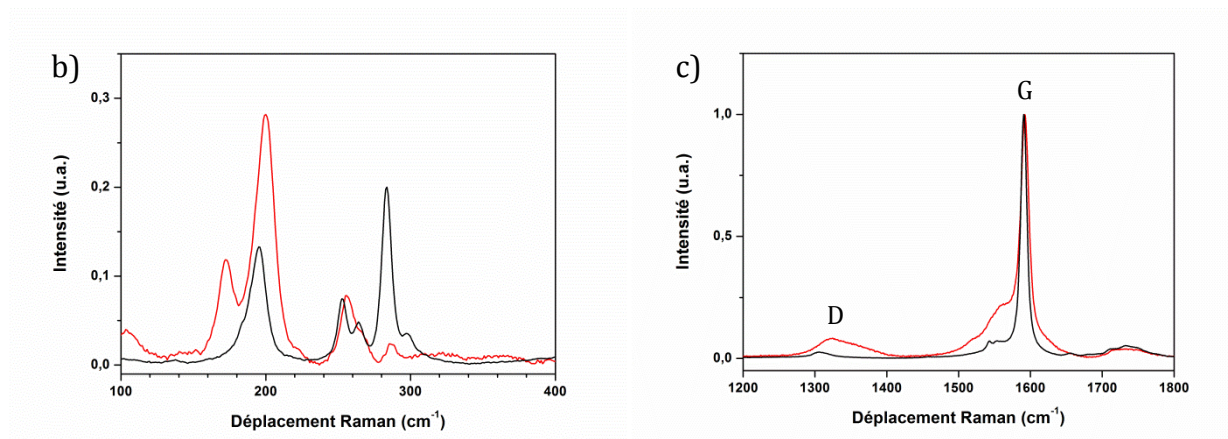


Figure III-26 : Spectres Raman : a) généraux, b) des RBM et c) des bandes D et G, à 638 nm des surnageants avant DGU des CNTs bruts (en noir) et des CNTs oxydés 8h (en rouge).

On remarque une augmentation de l'intensité de la bande D (ainsi que de la bande 2D) pour les nanotubes oxydés, ce qui est le signe d'un plus grand nombre de défauts à la surface des nanotubes. Ceci est confirmé par une augmentation du rapport I_D/I_G de 0,028 à 0,082.

On constate que le profil des bandes RBM n'est pas le même entre les deux spectres : les pics RBM à $283,2\text{ cm}^{-1}$ et $297,5\text{ cm}^{-1}$ sont fortement diminués pour les CNTs oxydés tandis qu'ils sont intenses pour les CNTs bruts. Les nanotubes de faible diamètre sont en quantité plus importante chez les nanotubes bruts que chez les nanotubes oxydés. Les nanotubes de faible diamètre sont préférentiellement dégradés par l'oxydation car la structure du squelette carbonée est plus contrainte que celle de nanotubes de plus gros diamètre. Les nanotubes de plus gros diamètre (entre 160 cm^{-1} et 220 cm^{-1}) ont des pics RBM plus intenses car moins dégradés par le traitement acide que les CNTs de faible diamètre. Un tri des CNTs oxydés selon leur diamètre après DGU est également constaté (**Annexe IV p. 121**).

- SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION

La **Figure III-27** montre les spectres d'absorption des CNTs oxydés après DGU.

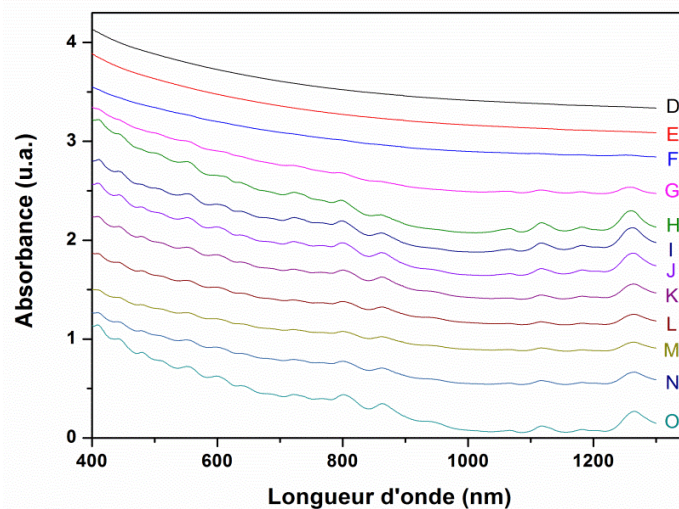


Figure III-27 : Spectres d'absorption des différentes fractions de nanotubes oxydés après DGU.

Il est constaté une perte du signal d'absorbance pour un certain nombre de chiralités et ceci pour toutes les fractions, comparé aux nanotubes bruts (**Figure III-12 p. 72**). Il n'y a également pas de décalage spectral vers les plus basses longueurs d'onde pour les fractions hautes. Ceci est dû au fait que la paroi des nanotubes a été fragilisée et dégradée par le traitement à l'acide nitrique. La structure électronique des nanotubes est ainsi dramatiquement modifiée.

Il est à noter que les fractions D et E sont exemptes de tous signaux optiques.

La **Figure III-28** compare les quantités de CNTs présentes dans chaque fraction après DGU pour les nanotubes bruts et les nanotubes oxydés pour des conditions d'applications des US de 5h et 24W de puissance.

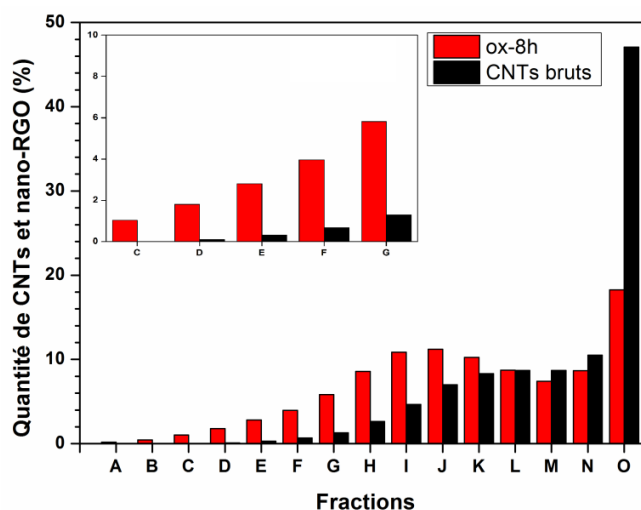


Figure III-28 : Histogrammes des quantités de CNTs après DGU pour les nanotubes oxydés (en noir) et les nanotubes bruts (en rouge). Un zoom sur les nanotubes les plus courts est indiqué sur la figure. Il est possible que les CNTs oxydés soient « dézippés » pour les fractions les plus hautes.

Il faut noter qu'il y a beaucoup moins de CNTs longs dans les fractions basses du tube d'ultracentrifugation après DGU pour les CNTs oxydés que pour les nanotubes bruts. On constate également qu'il y a beaucoup plus de nano-objets courts avec une oxydation de 8h à l'acide nitrique couplée à la sonication que pour une dispersion avec des nanotubes bruts. Les quantités de CNTs courts oxydés obtenus après DGU pour les fractions C à H vont de 13,25 à 62,85 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, soit un gain d'un ordre de grandeur comparé aux CNTs bruts.

3 SYSTEME CTAB

3.1 GENERALITES

Les sels biliaries sont très largement utilisés dans la littérature ainsi que dans notre groupe pour disperser les CNTs. Ce tensioactif permet de conserver la photoluminescence des CNTs et peut être utilisé à de faibles concentrations. C'est un excellent système modèle que nous avons utilisé pour la mise au point de la scission des nanotubes. Ce tensioactif n'est cependant pas idéal pour les tests biologiques car il peut provoquer la lyse des membranes cellulaires [Billington].

Ce phénomène peut être contré par l'utilisation de tensioactifs neutres ou l'emploi de tensioactifs sous la CMC. C'est pourquoi nous avons choisi de changer de tensioactif pour disperser les CNTs avec l'utilisation du bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) (*Figure III-29*).

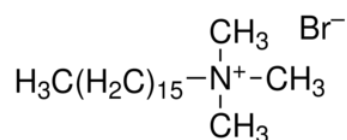


Figure III-29 : Représentation schématique du CTAB.

Le CTAB est également toxique mais peut être utilisé sans excès de tensioactif en solution au-delà de la CMC (en très faible concentration et sans micelles).

Le CTAB est un tensioactif cationique qui possède un point de cristallisation (ou point de Krafft, T_K) à 25°C et une concentration micellaire critique (CMC) de 1 mM. En dessous de cette température, le CTAB cristallise, la concentration en monomères dans la solution diminue et se retrouve alors en dessous de la CMC (*Figure III-30*) [Laughlin].

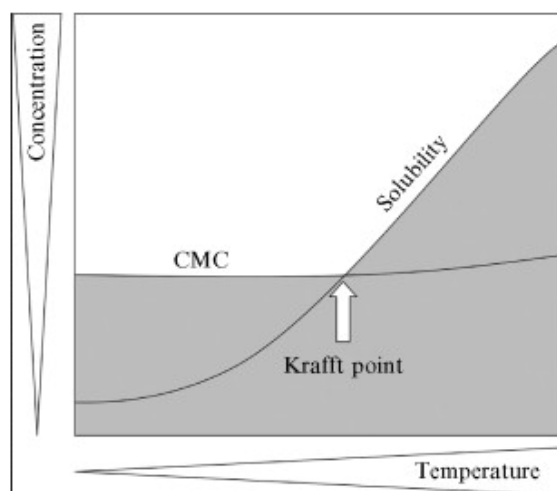


Figure III-30 : Représentation schématique du point de Krafft en fonction de la température et de la concentration en tensioactif.

3.2 PROTOCOLE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

Ce phénomène est exploité ici avec la réalisation de dispersions de CNTs avec du CTAB. 10 mg de nanotubes HiPCO et 33 mg de CTAB sont suspendus dans un volume de 10 mL d'eau mQ (0,1% massique CNTs/0,33% massique CTAB). Une dispersion de CNTs est réalisée à l'aide de la sonde à US à une puissance de 24 W pendant 5h. Celle-ci est ensuite maintenue une nuit à 4°C ($T^{\circ} < T_K$) afin de provoquer la cristallisation des micelles excédentaires du CTAB. Ce procédé, couplé à une centrifugation de 5 min à 2400 g, permet d'éliminer le tensioactif excédentaire des dispersions : seul le tensioactif adsorbé à la surface des nanotubes et sous forme de monomères en solution est conservé. Le CTAB est alors conservé à une concentration bien inférieure à la CMC, suffisamment pour maintenir les CNTs en dispersion [Dölle].

Le CTAB possède également une longue chaîne carbonée à 16 carbones : ce tensioactif s'adsorbe sur le CNT par des interactions de van der Waals, rendant la désorption plus lente et difficile qu'avec l'utilisation d'autres tensioactifs.

Les protocoles d'ultracentrifugation et de DGU restent les mêmes pour ce système.

3.3 CARACTERISATIONS

3.3.1 MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE

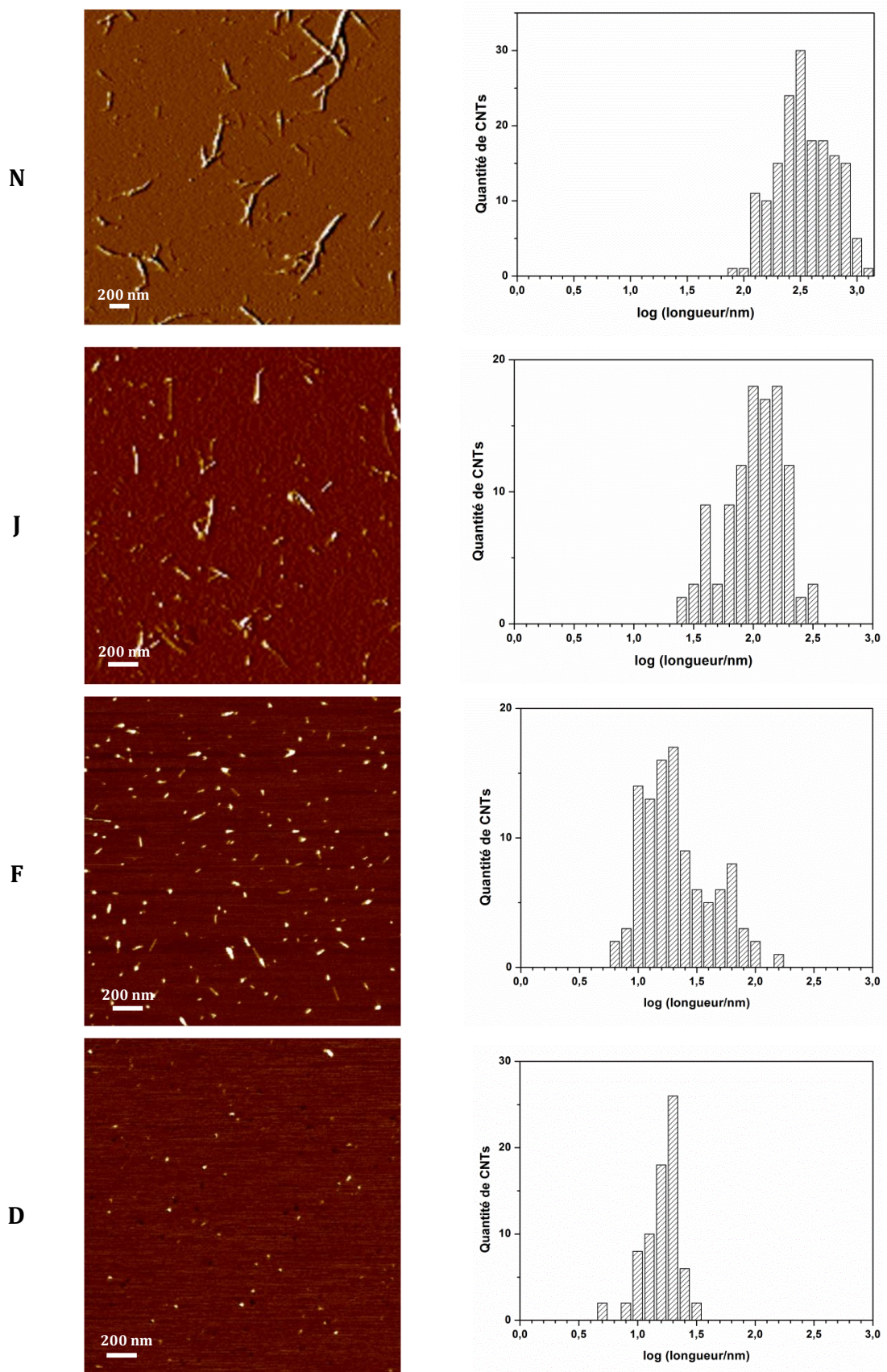


Figure III-31 : Images AFM de différentes fractions de nanotubes après l'étape de DGU. Les histogrammes de longueur correspondants sont présentés à côté de l'image AFM correspondante.

Le **Tableau III-5** rassemble les statistiques sur les longueurs obtenues à partir des images AFM.

Fraction	Moyenne (nm)	Médian (nm)	Min - Max (nm)
N	356 ± 210	296	78 - 1146
J	107 ± 57	98	23 - 288
F	25 ± 21	17	6 - 130
D	16 ± 5	16	4 - 31

Tableau III-5 : Statistiques sur les longueurs des nanotubes présents dans les différentes fractions prélevées à l'issue de la DGU évalués en AFM.

Les fractions hautes du tube à ultracentrifugation (C à G) présentent des nanotubes courts, pour la plupart individualisés, d'une longueur inférieure à 20 nm. D'une manière générale, le tri effectué par DGU avec le système CTAB semble plus adapté à la sélection de nanotubes ultracourts que le système présenté précédemment avec les sels biliaries. Ces résultats suggèrent que le complexe CTAB-CNT est légèrement moins dense que le complexe sels biliaries-CNT.

3.3.2 SPECTROSCOPIE RAMAN

La **Figure III-32** compare l'évolution des rapports I_D/I_G pour les systèmes avec sels biliaries et CTAB.

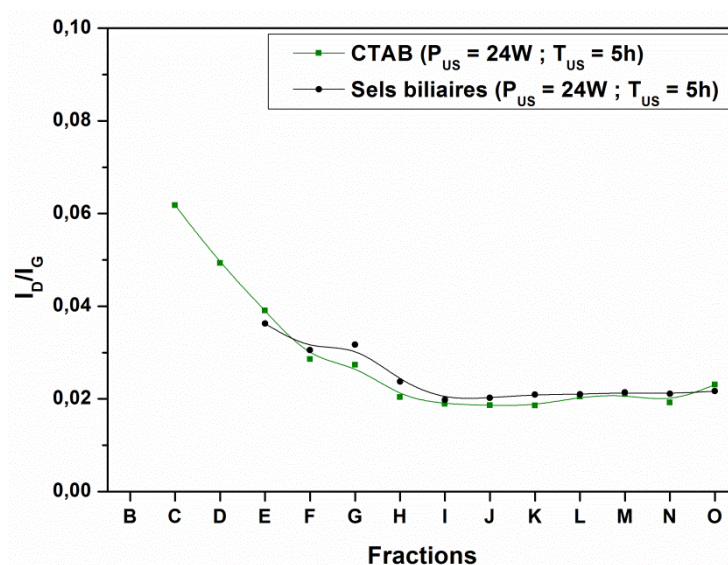


Figure III-32 : Evolution des rapports I_D/I_G en fonction des fractions prélevées après DGU pour les deux systèmes (sels biliaries (en noir) et CTAB (en vert)) d'application des ultrasons (les courbes sont indiquées pour guider le lecteur).

Nous constatons également une augmentation du rapport I_D/I_G pour les fractions les plus hautes du tube à ultracentrifugation après DGU pour le système CTAB (**Figure III-32 courbe verte**). La comparaison des deux systèmes montre que le tensioactif utilisé n'influence pas la cinétique de scission des nanotubes, la tendance de l'évolution des rapports I_D/I_G étant la même.

3.3.3 SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION

La **Figure III-33** montre les spectres d'absorption des CNTs dispersés par le CTAB après DGU.

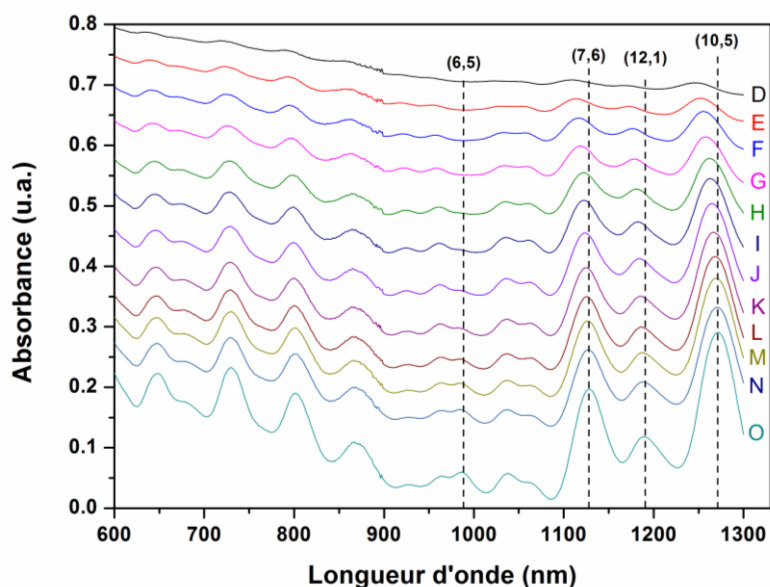


Figure III-33 : Spectres d'absorption des différentes fractions de nanotubes après DGU et prélèvement. Les chiralités semiconductrices sont indiquées pour quelques espèces.

Les décalages spectraux sont calculés de la même manière que ceux montrés pour le système sels biliaires et sont présentés dans la **Figure III-34**.

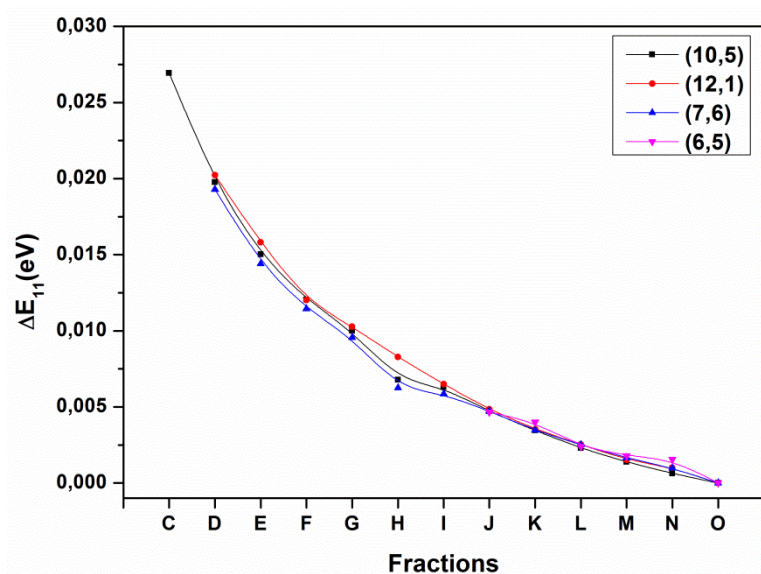


Figure III-34 : Décalages spectraux pour quatre chiralités semiconductrices. Les courbes ne sont pas des modélisations mathématiques et sont indiquées pour guider le lecteur.

Tout comme pour le système sels biliaires, les longueurs théoriques sont calculées à partir des décalages spectraux déterminés pour les fractions hautes (**Tableau III-6**).

Fraction	Longueur théorique (nm)
D	14-19
E	15-20
F	19-25
G	23-31
H	38-41

Tableau III-6 : Tableau des longueurs théoriques des CNTs après DGU.

Les longueurs théoriques estimées pour les fractions les plus hautes sont en dessous de 20 nm, et traduisent le raccourcissement grâce à la sonication ainsi que le tri des CNTs par le processus de DGU. Elles sont bien corrélées aux longueurs déterminées par AFM pour les fractions les plus hautes du tube à ultracentrifugation.

La **Figure III-35** compare les quantités de CNTs obtenus après DGU pour les systèmes sels biliaires et CTAB à puissance et temps de sonication équivalents.

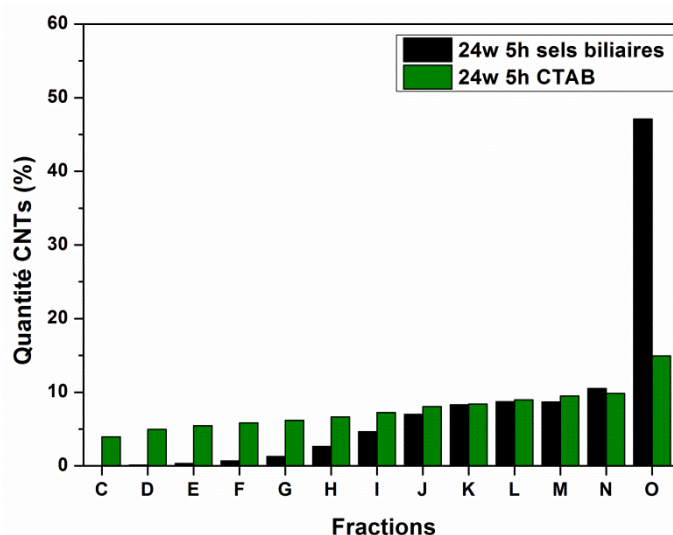


Figure III-35 : Comparaison du pourcentage de CNTs par fraction entre les différentes DGU.

Il y a beaucoup plus de nanotubes courts dans le système avec CTAB qu'avec le système sels biliaires, à puissance et temps d'application des US équivalents. Les quantités de CNTs obtenus après DGU avec CTAB pour les fractions D à H vont de 5,86 à 7,84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, contre 0,47 à 12,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le système sels biliaires.

4 BILAN DU CHAPITRE III

La méthode de tri des nanotubes par ultracentrifugation en gradient de densité est plus efficace que d'autres procédés tels que la chromatographie par exclusion stérique ou le FFF par exemple. La DGU est de plus un procédé aisé, rapide et reproductible.

Nous montrons dans ce chapitre l'obtention de nanotubes de carbone courts et ultracourts pour différents systèmes (sels biliaires, oxydation et CTAB) par l'utilisation des ultrasons suivie du tri par ultracentrifugation en gradient de densité. Les nanotubes obtenus par ce procédé présentent des longueurs inférieures à 20 nm pour les fractions les plus hautes. Les quantités obtenues sont de l'ordre de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les fractions contenant des CNTs ultracourts, grandeurs qui n'existaient malheureusement pas dans la littérature [Fagan, Kuang, Sun].

Nous avons montré que l'ultracentrifugation en gradient de densité peut être optimisée par l'utilisation d'un tensioactif cationique et en plus par des effets d'oxydation, ce qui permet d'augmenter le rendement en nanotubes ultracourts, et de rendre ces systèmes mieux adaptés à des futures applications biologiques.

Le **Chapitre IV** aborde la biofonctionnalisation par des anticorps monoclonaux de CNTs courts et longs et leur utilisation comme marqueur proche infrarouge par photothermie.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Arnold, M. S., Green, A. A., Hulvat, J. F., Stupp, S. I. & Hersam, M. C. *Nature Nanotechnology* **1**, 60–65 (2006).
- Billington, D., Evans, C. E., Godfrey, P. P. & Coleman, R. *Biochemical Journal* **188**, 321–327 (1980).
- Chou, S. G., Son, H., Kong, J., Jorio, A., Saito, R., Zheng, M., Dresselhaus, G. & Dresselhaus, M. *Applied Physics Letters* **90**, 131109 (2007).
- Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., Kallitsis, I. & Galiotis, C. *Carbon* **46**, 833–840 (2008).
- Dölle, S., Lechner, B.-D., Park, J. H., Schymura, S., Lagerwall, J. P. F. & Scalia, G. *Angewandte Chemie International Edition* **51**, 3254–3257 (2012).
- Fagan, J. A., Becker, M. L., Chun, J., Nie, P., Bauer, B. J., Simpson, J. R., Hight-Walker, A. & Hobbie, E. K. *Langmuir* **24**, 13880–13889 (2008).
- Kuang, Y., Liu, J. & Sun, X. *The Journal of Physical Chemistry C* **116**, 24770–24776 (2012).
- Laughlin, R. G. *The Aqueous Phase Behavior of Surfactants*, Academic Press, New York (1996).
- Oudjedi, L. *Thèse : Méthodes d'absorption pour la microscopie de nano-objets individuels, Université de Bordeaux 1* (2012).
- Sun, X., Zaric, S., Daranciang, D., Welsher, K., Lu, Y., Li, X. & Dai, H. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 6551 (2008).
- Wang, F., Dukovic, G., Brus, L. E. & Heinz, T. F. *Science* **308**, 838–841 (2005).

Ye, R., Xiang, C., Lin, J., Peng, Z., Huang, K., Yan, Z., Cook, N. P., Samuel, E. L. G., Hwang, C-C., Ruan, G., Ceriotti, G., Raji, A-R. O., Marti, A. A. & Tour, J. M. *Nature Communications* **4**, 1–6 (2013).

Chapitre IV

Biofonctionnalisation de nanotubes de carbone

1	Introduction.....	98
2	Fonctionnalisation de SWCNTs oxydés par la biotine	98
2.1	Généralités	98
2.2	Protocole de couplage.....	99
2.3	Préparation des échantillons	100
2.4	Protocole de préparation des surfaces	101
2.5	Analyse des surfaces fonctionnalisées par photothermie.....	102
3	Fonctionnalisation de SWCNTs par un anticorps monoclonal	103
3.1	Généralités	103
3.2	Préparation des échantillons de CNTs oxydés.....	105
3.3	Protocole d'incubation des CNTs avec des cellules COS7.....	106
3.4	Analyses par méthode PHI.....	107
3.5	Préparation des échantillons de CNTs bruts	108
3.5.1	Système CTAB	108
3.5.2	Système SDS	109
3.5.3	Systèmes PE-PEG 920 et Brij 78.....	109
3.6	Analyses photothermiques.....	109
3.7	Fonctionnalisation de SWCNTs ultracourts.....	112
3.7.1	Protocole de couplage	112
3.7.2	Analyses photothermiques.....	113
4	Bilan du Chapitre IV.....	114
5	Bibliographie	115

1 INTRODUCTION

Nous présentons dans ce **Chapitre IV** la fonctionnalisation covalente de SWCNTs bruts et oxydés par un dérivé biotinylé et un anticorps monoclonal (Panitumumab).

Des analyses photothermiques obtenues sur des surfaces streptavidinées et des cellules fixées COS7 sont présentées.

2 FONCTIONNALISATION DE SWCNTs OXYDES PAR LA BIOTINE

2.1 GENERALITES

Nous présentons ici les résultats obtenus sur la fonctionnalisation covalente de CNTs non triés par des biotines puis leur assemblage sur des surfaces recouvertes de streptavidine. La biotine a été choisie car le système est simple et déjà largement utilisé [Chen, Kam].

Des CNTs longs sont utilisés car ces systèmes sont plus aisés à mettre en œuvre et susceptibles d'être observés avec plus de facilité par la suite.

La streptavidine est une protéine de 52,8 kDa, obtenue à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*, possédant une très forte affinité pour la biotine (ou vitamine B₈) (**Figure IV-1**).

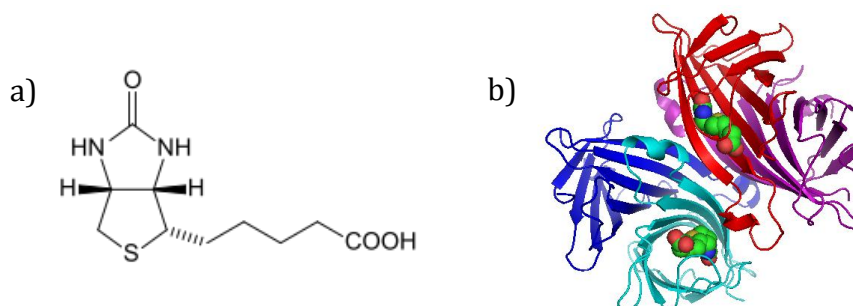


Figure IV-1 : a) Structure chimique de la biotine, et b) complexe streptavidine-biotine.

La liaison de la biotine à la streptavidine est l'une des plus fortes interactions non covalentes connues dans la nature avec une constante de dissociation (K_d) de l'ordre de $4 \cdot 10^{-14}$ mol.L⁻¹ [Green]. Le complexe streptavidine-biotine est également résistant aux solvants organiques, aux agents dénaturants, aux tensioactifs ioniques et à des températures et pH extrêmes [Savage, Tong].

Nous choisissons d'utiliser une biotine pégylée aminée (*O*-(2-Aminoethyl)-*O'*-[2-(biotinylamino)ethyl]octaethylene glycol) de chez Sigma-Aldrich pour fonctionnaliser les CNTs (**Figure IV-2**).

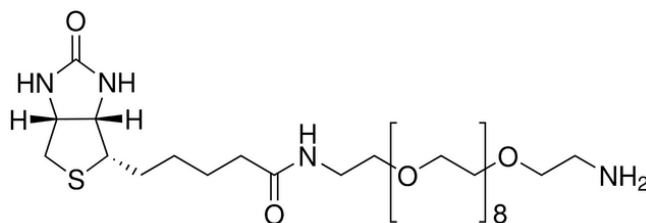


Figure IV-2 : Structure chimique de la biotine pégylée aminée.

Cette molécule présente plusieurs avantages : comme indiqué ci-dessus, la biotine possède une forte affinité avec la streptavidine, elle est hydrosoluble et peut être couplée aux fonctions acide carboxylique des CNTs grâce à son extrémité amine (**Figure IV-3**).

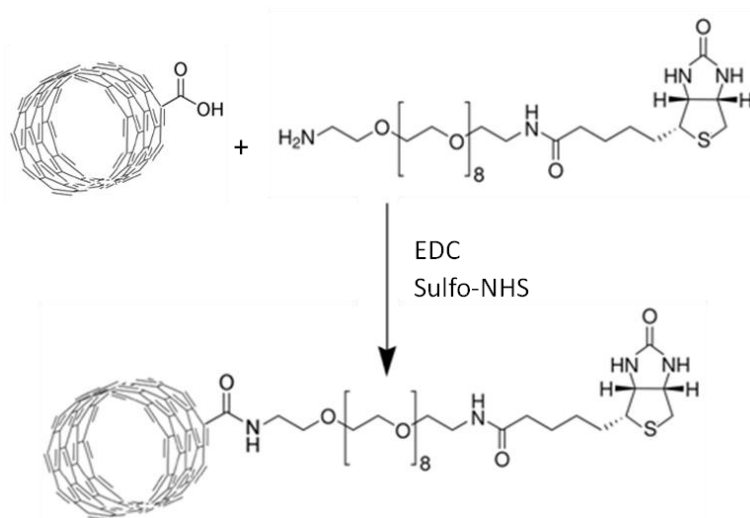


Figure IV-3 : Réaction de couplage peptidique entre un CNT et une biotine pégylée aminée.

2.2 PROTOCOLE DE COUPLAGE

Nous choisissons de coupler les biotines pégylées aux CNTs par estimation préalable de la surface des CNTs.

Un nanotube peut être assimilé à un cylindre possédant une aire de :

$$S = 2\pi r l \quad \text{Equation IV-1}$$

Avec r le rayon d'un nanotube et l sa longueur.

En considérant que le diamètre de SWCNTs HiPCO est en moyenne de 1 nm, la surface d'un nanotube S_{CNT} , selon **l'Equation IV-1**, varie selon sa longueur. Nous effectuons les calculs en estimant que la longueur moyenne des nanotubes non triés est de l'ordre de 100 nm.

Les quantités de nanotubes nécessaires pour les tests photothermiques sont de l'ordre de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. En considérant que la surface spécifique de SWCNTs est d'environ 1000 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ [Unidym], la surface de 5 μg de CNTs est ainsi $S_{\text{test}} = 0,005 \text{ m}^2$.

La quantité de nanotubes N_{CNT} contenue dans l'essai de 5 μg de CNTs est donc :

$$N_{\text{CNT}} = \frac{S_{\text{test}}}{S_{\text{CNT}}} \quad \text{Equation IV-2}$$

Nous choisissons de coupler les biotines pégylées aux nanotubes avec un ratio de 10/1 (biotines pégylées/CNT).

La quantité de biotine N_{biotine} à incorporer aux essais est donnée par les **Equations IV-3 et IV-4** :

$$n_{\text{biotine}} = \frac{m_{\text{biotine}}}{M_{\text{biotine}}} \quad \text{et} \quad N_{\text{biotine}} = n_{\text{biotine}} \times \mathcal{N}_A \quad \text{Equations IV-3 et IV-4}$$

Avec $\mathcal{N}_A = 6,022.10^{23} \text{ mol}^{-1}$ le nombre d'Avogadro, n_{biotine} le nombre de moles de biotine pégylée, m_{biotine} la masse de biotine pégylée en g, et M_{biotine} la masse molaire de la biotine pégylée = 683 g.mol^{-1} .

Les quantités de réactifs (EDC, N-hydroxysulfosuccinimide et biotine pégylée) nécessaires pour fonctionnaliser 5 μg de CNTs selon les conditions de couplage sont listées en **Annexe VII p. 124**.

2.3 PREPARATION DES ECHANTILLONS

10 mg de CNTs oxydés non triés sont dispersés avec 10 mg de PE-PEG 920 (polyethylene-block-poly(ethylene glycol) de chez Sigma-Aldrich (CMC = 28,8 mg/L) (**Figure IV-4**) dans 10 mL d'eau mQ pendant 5h à l'aide d'une sonde à ultrasons (pulses 0,5 s/0,2 s).

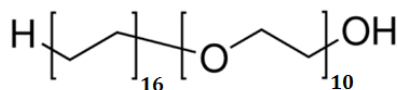


Figure IV-4 : Structure chimique du PE-PEG 920, composé de 50 wt.% d'oxyde d'éthylène ($M = 906 \text{ g.mol}^{-1}$).

L'ajout du PE-PEG 920 à la dispersion permet de la stabiliser et d'accroître la furtivité des CNTs. Ce tensioactif est un polymère non ionique présentant des chaînes hydrophobes pouvant se fixer par des interactions de van der Waals à la surface des nanotubes de carbone, la partie PEG restant exposée pour le stabiliser en solution aqueuse par établissement de liaisons hydrogène. Nous choisissons d'utiliser ce tensioactif avec un

nombre de motifs d'oxyde d'éthylène limité afin de ne pas gêner le couplage de la biotine pégylée à la surface des nanotubes.

La dispersion est ensuite centrifugée à 4000 rpm pendant 30 minutes afin d'éliminer les agglomérats de CNTs. 9 mL de surnageant sont récupérés et ultracentrifugés deux fois (après ajout d'eau milliQ en complément) à 244000 g pendant 3h afin d'éliminer les CNTs non dispersés et les fagots. Le surnageant est récupéré et analysé par spectroscopie d'absorption afin de déterminer la concentration précise en CNTs. Une dispersion contenant des CNTs oxydés à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est ainsi formulée.

9,9 μL d'EDC sont ajoutés à 1 mL de dispersion de CNTs oxydés ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sous agitation magnétique. 13,9 μL de Sulfo-NHS sont ajoutés au mélange 5 minutes après, puis 29 μL de biotine pégylée sont introduits après 5 minutes également. Le mélange réactionnel est agité pendant 2h. La solution est centrifugée à la fin de la réaction à 45000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et prêt à être utilisé.

2.4 PROTOCOLE DE PREPARATION DES SURFACES

Les surfaces de verre subissent un traitement préalable au plasma sous air dans le but de les nettoyer et de les oxyder afin de les rendre négatives. Un mélange de PEG-PLL (copolymère chargé positivement) concentré à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ et de streptavidine ($0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est réalisé dans un tampon phosphate salin (PBS) 1X. Une goutte (environ 50 μL) de ce mélange est déposée sur les surfaces et laissée pendant 60 minutes. Les surfaces sont ensuite lavées quatre fois au PBS 1X et sont alors entièrement couvertes de streptavidine.

100 μL de CNTs biotinylés ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sont incubés sur les surfaces streptavidinées pendant 10 minutes puis les surfaces sont lavées quatre fois au PBS 1X. Un échantillon contrôle est réalisé de la même manière mais sans streptavidine. L'assemblage final visé est présenté sur la **Figure IV-5**.

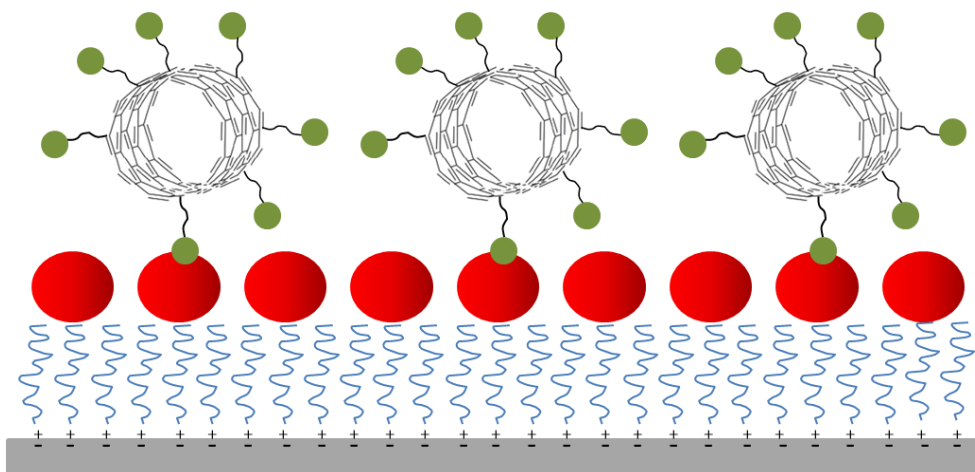


Figure IV-5 : Représentation schématique de l'assemblage du complexe CNT-biotine sur surface streptavidinée (lame de verre en gris, chaînes de PEG-PLL en bleu, streptavidine en rouge, biotine en vert).

Les surfaces sont ensuite analysées au microscope photothermique par la méthode PHI.

2.5 ANALYSE DES SURFACES FONCTIONNALISEES PAR PHOTOTHERMIE

Les tests photothermiques ont été réalisés au LP2N (Laboratoire Photonique, Numérique et Nanosciences) de l'université Bordeaux 1 par Zhenghong Gao, Laura Oudjedi et Pierre Vermeulen. La méthode PHI est présentée dans le **Chapitre II p. 56**.

La **Figure IV-6** présente les signaux photothermiques acquis sur les différents échantillons préparés.

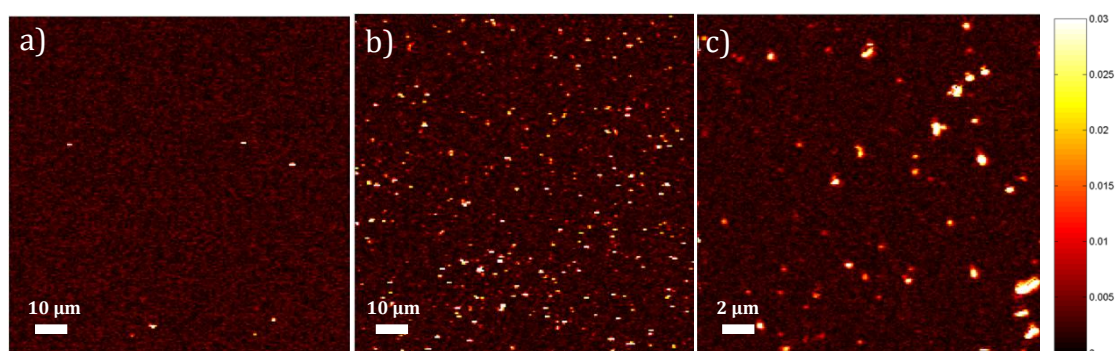


Figure IV-6 : Signaux photothermiques des CNTs pour différents échantillons. a) échantillon contrôle, b) CNTs oxydés biotinylés sur surface streptavidinée et c) zoom sur l'échantillon.

L'échantillon contrôle (**Figure IV-6 a**) ne présente que très peu de signal photothermique, indiquant que peu de CNTs restent fixés sur la surface non streptavidinée, après les différents lavages. Il n'y a ainsi que peu d'adsorption non spécifique des CNTs sur la surface.

L'échantillon testé comporte des signaux photothermiques de CNTs répartis de façon homogène (**Figures IV-6 b**) et **c**). La surface streptavidinée est ainsi couverte de façon homogène par des complexes CNTs-biotine.

Cette stratégie de fonctionnalisation est validée par ces résultats.

3 FONCTIONNALISATION DE SWCNTs PAR UN ANTICORPS MONOCLONAL

3.1 GENERALITES

La stratégie de fonctionnalisation étant validée par les tests effectués avec la biotine pégylée sur les CNTs oxydés, nous proposons d'effectuer la fonctionnalisation de façon covalente de CNTs par le Panitumumab, un anticorps (Ac) monoclonal de la famille des immunoglobulines G₂ (IgG₂) (**Figure IV-7**) avec pour but final d'imager la complexation de ces anticorps sur des cellules exprimant le récepteur de l'EGF (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor).

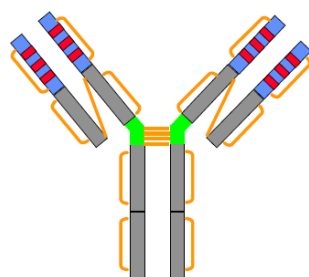


Figure IV-7 : Représentation schématique de l'anticorps monoclonal de la famille des IgG Panitumumab, constitué de deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Les 18 ponts disulfures sont représentés en orange, la région charnière (flexible) en vert, les fragments constants sont représentés en gris et les fragments variables en rouge et bleu.

Le Panitumumab est commercialisé sous la forme du médicament Vectibix® pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques. Les cellules cancéreuses sur-expriment le récepteur de l'EGF, entraînant une cascade de réactions aboutissant à la prolifération cellulaire, à l'inhibition de l'apoptose et l'invasion cellulaire par exemple (**Figure IV-8**). Son inactivation par le Panitumumab bloque le développement des cellules tumorales : le Panitumumab se fixe au domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF, empêchant son activation par d'autres facteurs.

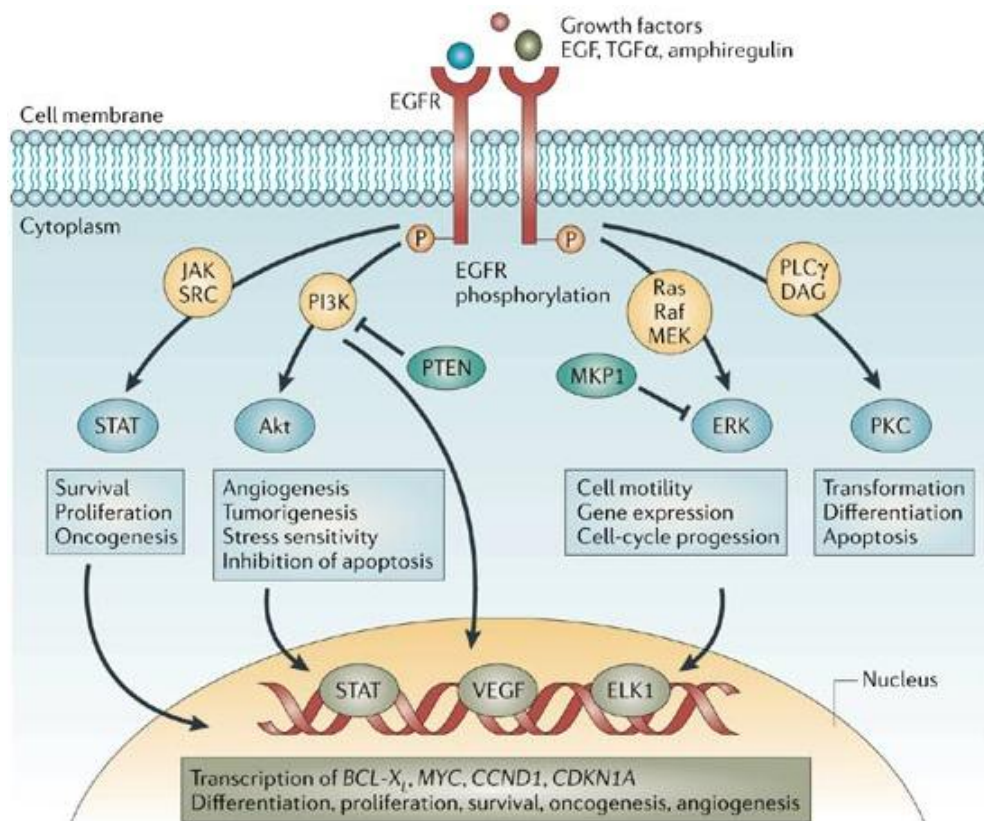


Figure IV-8 : Signalisation en cascades du récepteur à l'EGF. [Nyati]

Le Panitumumab est une protéine de 144,3 kDa de masse moléculaire, constituée de 1318 acides aminés (**Annexe V p. 122**). Cet Ac peut être couplé aux CNTs par une réaction d'amidation, ou couplage peptidique, entre les fonctions carboxyliques des CNTs et les groupements amine (**Figure IV-9**) de certains acides aminés basiques de sa séquence (lysines).

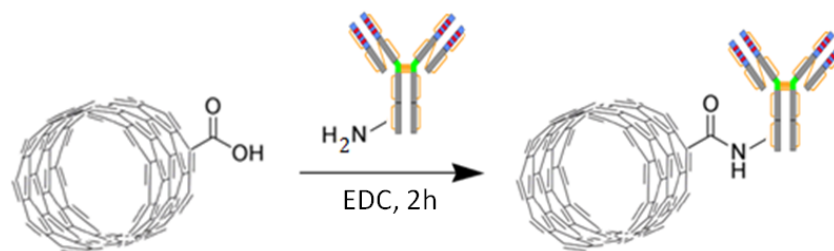


Figure IV-9 : Réaction d'amidation entre Ac et CNTs.

Notre stratégie est d'utiliser cet anticorps sur les nanotubes de carbone afin d'imager leur signal photothermique sur des cellules exprimant le récepteur à l'EGF (**Figure IV-10**).

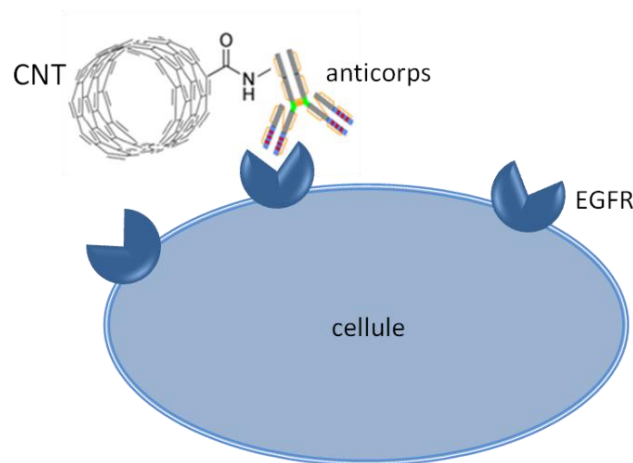


Figure IV-10 : Représentation schématique de la stratégie de vectorisation du CNT par l'anticorps sur les récepteurs à l'EGF (EGFR).

3.2 PREPARATION DES ECHANTILLONS DE CNTs OXYDES

Nous avons formulé des dispersions concentrées à $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CNTs non triés oxydés (protocole détaillé **section 2.3 p. 98**) et bruts (**section 3.5.3 p. 107**).

Une migration sur gel d'électrophorèse en conditions natives (PAGE, pour Polyacrylamide Gel Electrophoresis) a été réalisée afin de montrer la fonctionnalisation covalente des CNTs par l'anticorps (**Figure IV-11**). Le principe et le protocole de la PAGE sont rapportés dans le **Chapitre II p. 54**.

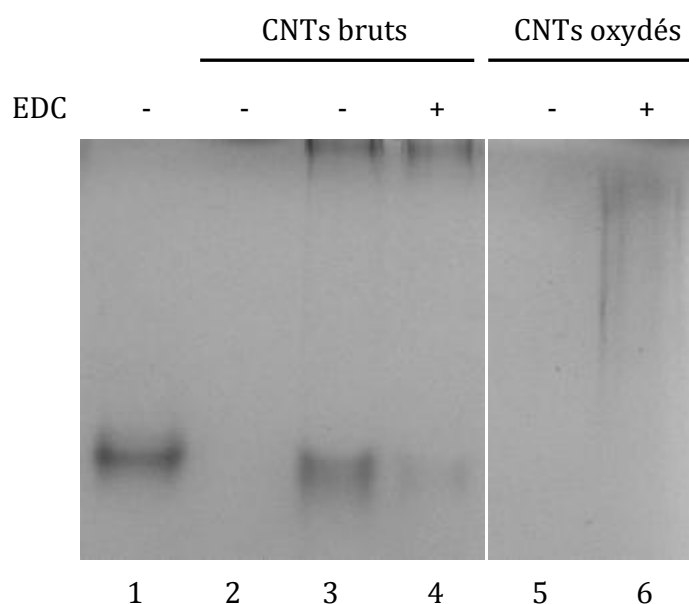


Figure IV-11 : Gel d'électrophorèse en conditions natives de l'anticorps Panitumumab (ligne 1), des CNTs bruts seuls (ligne 2), fonctionnalisés par l'anticorps avec (ligne 4) ou sans EDC (ligne 3), et des CNTs oxydés seuls (ligne 5) ou fonctionnalisés par l'anticorps avec EDC (ligne 6).

L'anticorps seul (144,3 kDa) est utilisé comme référence pour l'analyse (**Figure IV-11 ligne 1**).

La **Figure IV-11 lignes 3 et 4** montre que les CNTs bruts dispersés dans le PE-PEG 920 et fonctionnalisés par l'anticorps avec ou sans EDC restent dans le gel de concentration et ne migrent pas. La longueur des CNTs est trop grande pour que ceux-ci traversent le maillage de polyacrylamide. Nous observons également que la quantité d'anticorps libre est plus faible quand la fonctionnalisation est effectuée avec EDC (**Figure IV-11 ligne 4**). Ceci est en accord avec une fonctionnalisation covalente des CNTs par l'anticorps en présence de l'agent de couplage EDC.

Il est observé un étalement (*smear*) de CNTs oxydés dans le gel d'électrophorèse (**Figure IV-11 ligne 6**). Les CNTs pénètrent avec l'anticorps dans le maillage d'acrylamide et sont séparés selon leur taille. Tous les anticorps sont couplés aux CNTs car il ne subsiste plus d'anticorps libre.

Les quantités de réactifs (EDC et anticorps) nécessaires au couplage sont déterminées à partir de la surface d'un SWCNT (voir **Chapitre IV 2.2 p. 97**) mesurant 100 nm de long et pour un ratio CNT/anticorps de 10/1 (voir **Annexe VII p. 124**).

1 mL de solution de CNTs ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dispersés par le PE-PEG 920 est mis en réaction avec 0,8 ng de EDC pendant 5 minutes, puis 0,38 μg d'anticorps pendant 2h. La solution est ensuite ultracentrifugée à 45000 rpm pendant 10 min.

Le surnageant de CNTs oxydés fonctionnalisés est mis en incubation avec les cellules selon le protocole décrit ci-après.

3.3 PROTOCOLE D'INCUBATION DES CNTS AVEC DES CELLULES COS7

Les cellules COS7 utilisées pour les tests de photothermie sont des cellules fibroblastiques dérivées de la souche cellulaire CV-1. La souche cellulaire CV-1 est elle-même dérivée de cellules rénales du singe vert *Cercopithecus Aethiops*. Dans notre cas, ces cellules ont été transfectées pour sur-exprimer le récepteur à l'EGF.

Les cellules COS7 sont fixées sur des lames de verre par ajout de méthanol, puis traitées 30 minutes avant incubation avec une solution aqueuse contenant 1 à 3 % de BSA afin de bloquer une partie des récepteurs à EGF. Les cellules sont ensuite incubées avec les SWCNTs ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pendant 1 heure. Les surfaces subissent ensuite 3 lavages successifs afin d'éliminer les nanotubes non fixés aux cellules : lavage avec une solution de PBS 1X contenant de 1 à 3% de BSA, lavage avec une solution de PBS 1X contenant 1 % de BSA, et lavage avec solution de PBS 1X.

Les surfaces sont ensuite analysées à l'aide de la méthode PHI.

3.4 ANALYSES PAR METHODE PHI

La **Figure IV-12** correspond aux clichés confocal et photothermique de l'échantillon contrôle constitué uniquement de cellules COS7.

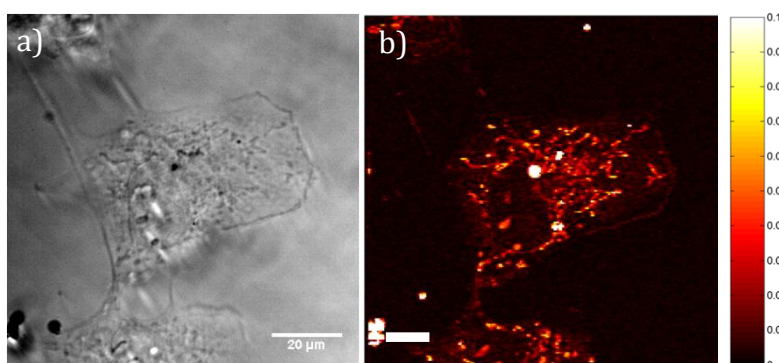


Figure IV-12 : Cellules COS7 ; a) Cliché de microscopie confocale. b) Cliché photothermique. La barre de l'échelle est de 10 μm .

Il est décelé un faible signal photothermique (environ 0,05) sur les cellules COS7 analysées (**Figure IV-12 b**), inhérent aux mitochondries du cytoplasme [Lasne]. Pour indication, le noyau des cellules COS7 est en noir.

La **Figure IV-13** présente les résultats obtenus en imagerie photothermique pour des CNTs oxydés non triés dispersés dans le PE-PEG 920, et fonctionnalisés ou non par l'anticorps.

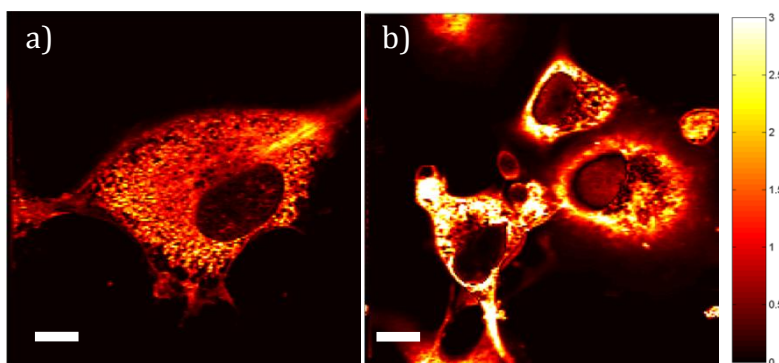


Figure IV-13 : Images photothermiques de a) cellules COS7 et CNTs oxydés longs ; b) cellules COS7 et complexes anticorps-CNTs longs. Plusieurs zones des échantillons ont été imagées à chaque fois. La barre des échelles des images obtenues par PHI est de 10 μm .

Bien que les spectres d'absorption des CNTs soient fortement modifiés par l'oxydation (voir **Chapitre III p. 87**), les signaux photothermiques sont intenses dans chaque cas de figure (entre 1,5 et 2,5). La fonctionnalisation de CNTs par traitement oxydant est tout à fait compatible avec des études photothermiques.

Il n'y a cependant pas de différences d'intensité de signal photothermique entre des échantillons ne comportant que des cellules et des CNTs, et ceux où les CNTs sont biofonctionnalisés par l'anticorps (**Figure IV-13 a**) et **Figure IV-13 b**). Les cellules COS7 sont recouvertes uniformément par les CNTs. La fixation non spécifique est très importante avec des CNTs oxydés couplés ou non à un anticorps.

Il est possible que la forte adsorption des CNTs sur les membranes cellulaires soit due à la présence d'un trop grand nombre de groupements carboxyliques à la surface des CNTs oxydés.

Nous choisissons donc de vérifier la furtivité du système proposé en effectuant des tests avec des CNTs bruts longs non triés et non fonctionnalisés. Ceci permettra également de comparer les deux systèmes (CNTs oxydés et CNTs brut) sur le plan optique.

Nous choisissons d'observer le rôle de divers tensioactifs contenant des chaînes PEG de différentes longueurs sur la furtivité des CNTs vis-à-vis des cellules. Ainsi, l'emploi de deux tensioactifs non ioniques différents est envisagé :

- Le PE-PEG 920.
- Le Brij 78 (**Figure IV-14**).

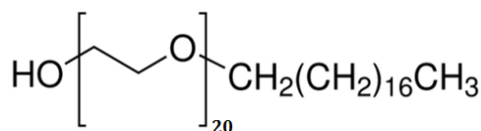


Figure IV-14 : Structure chimique du Brij 78, composé à 76 wt.% d'oxyde d'éthylène ($M = 1150 \text{ g.mol}^{-1}$). Le bloc PEG du Brij 78 est plus long que celui du PE-PEG 920.

Deux dispersions de CNTs avec des tensioactifs ioniques (le SDS, tensioactif anionique, et le CTAB, tensioactif cationique) sont également formulées et font office de contrôle.

3.5 PREPARATION DES ECHANTILLONS DE CNTS BRUTS

3.5.1 SYSTEME CTAB

Une dispersion de CNTs est réalisée suivant le protocole présenté **chapitre III p. 89**. Une fraction de la dispersion est diluée pour obtenir une concentration en CNTs de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.5.2 SYSTEME SDS

30 mg de CNTs bruts et 100 mg de SDS sont dispersés dans un volume de 10 mL d'eau milliQ (0,3% CNTs/1% SDS) à l'aide d'ultrasons ($P_{US} = 24W$, et $T_{US} = 5h$). Deux ultracentrifugations à 45 000 rpm pendant 3h sont appliquées afin d'éliminer les fagots de nanotubes et ne conserver que des CNTs individualisés. Le surnageant est récupéré et une fraction est diluée pour obtenir une concentration en CNTs de $5 \mu g.mL^{-1}$.

3.5.3 SYSTEMES PE-PEG 920 ET BRIJ 78

Nous choisissons d'utiliser le PE-PEG 920 précédemment présenté et le Brij 78 (octadecyl éther d'eicosaéthylène glycol) de chez Fluka afin d'augmenter la furtivité des CNTs.

Des essais de dispersions aqueuses de CNTs bruts par ces tensioactifs ont été réalisés. Il s'avère que les CNTs précipitent lors des ultracentrifugations (244000 g pendant 3h). Les CNTs ne sont pas individualisés par ces surfactants et doivent rester sous forme de fagots.

Nous utilisons la dispersion de CNTs réalisée dans le SDS et réalisons l'échange de ce tensioactif par le PE-PEG 920 ou le Brij 78 par dialyse. Les membranes de dialyse utilisées sont des SnakeSkin Tubing de Thermo Scientific d'une porosité de 3,5 kDa.

4 mL d'eau milliQ sont ajoutés à 1 mL de solution de CNTs bruts dispersés dans le SDS. La solution obtenue est ensuite dialysée pendant 3 jours dans une solution aqueuse contenant 0,07% de PE-PEG 920 (ou 0,07% de Brij 78), avec un changement de bain une fois par jour. Des tests de conductivité effectués prouvent l'échange du SDS par le PE-PEG 920 ou le Brij 78 et la formulation de dispersions stables (voir **Annexe VIII p. 125**).

Une fraction des solutions dialysées est prélevée et diluée afin d'obtenir une concentration finale en CNTs de $5 \mu g.mL^{-1}$ pour chaque système de tensioactif. Les dispersions sont ensuite incubées avec les cellules COS7 selon le protocole présenté **p. 104** puis analysées par photothermie.

3.6 ANALYSES PHOTOTHERMIQUES

La **Figure IV-15** correspond aux clichés photothermiques (excepté la **Figure IV-15 a**) des échantillons contrôles constitués uniquement de cellules COS7, et des clichés obtenus sur des cellules COS7 fixées pour des nanotubes bruts non triés dispersés dans différents tensioactifs.

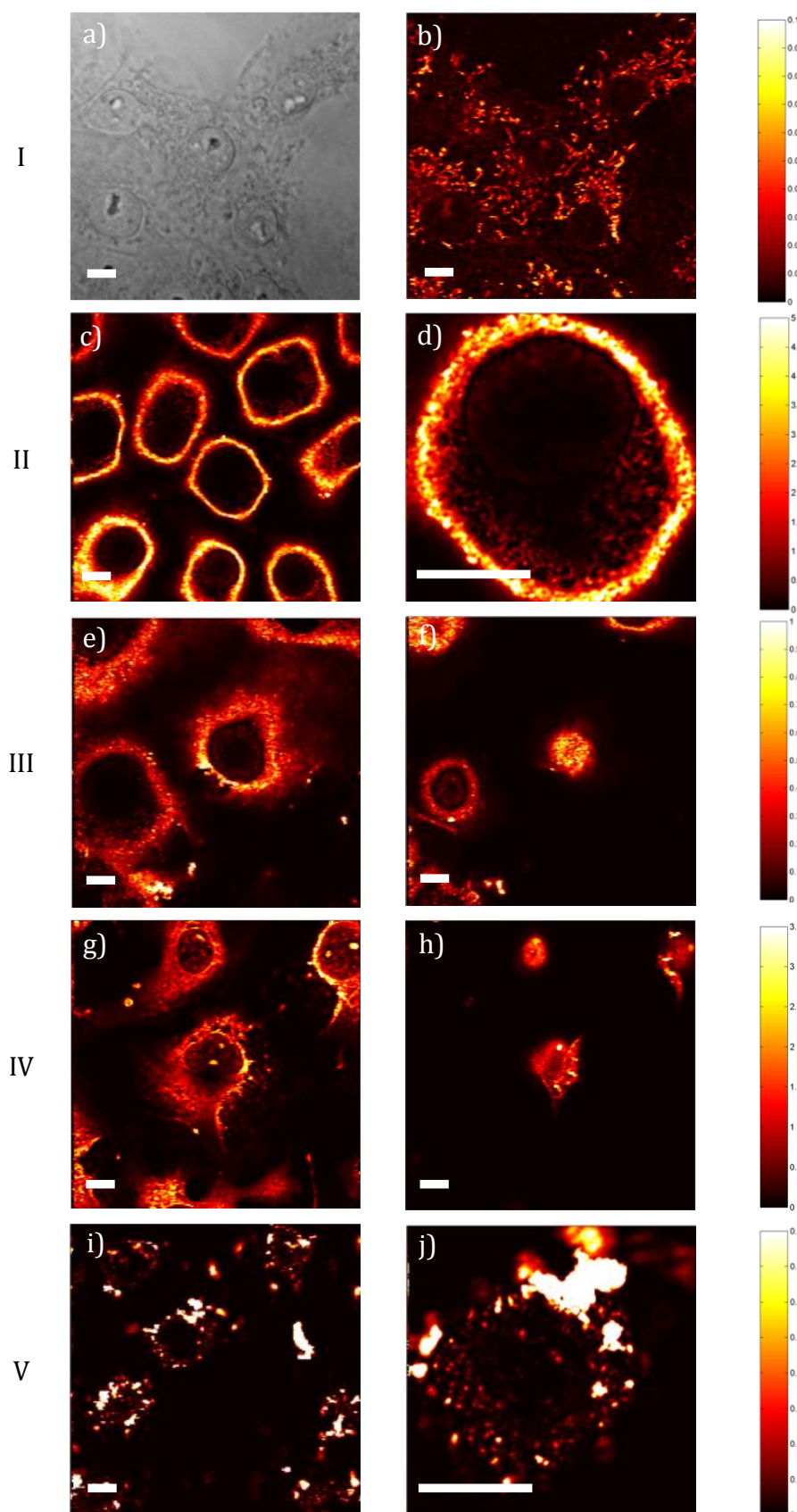


Figure IV-15 : ligne I : cellules COS7 seules ; cellules COS7 avec, II : CNTs dispersés dans PE-PEG920 ; III : CNTs dispersés dans Brij78 ; IV : CNTs dispersés dans SDS ; V : CNTs dispersés dans CTAB. Images photothermiques des CNTs pour les différents systèmes (sauf a) cliché confocal). Plusieurs zones des échantillons ont été imagées à chaque fois. La barre des échelles est de 10 μm .

Le **Tableau IV-1** regroupe l'intensité des signaux photothermiques des cellules ou des CNTs pour les quatre tensioactifs utilisés.

Système utilisé	Intensité maximale des signaux photothermiques
Contrôle	0,05
PE-PEG 920	5
Brij 78	1
SDS	3,5
CTAB	0,8

Tableau IV-1 : Intensité des signaux photothermiques pour les quatre systèmes étudiés.

Les échantillons de CNTs dispersés par le SDS donnent des signaux intenses (**Figure IV-15 Ligne IV** et **Tableau IV-1**). Les CNTs sont fortement collés aux cellules : les répulsions électrostatiques attendues entre les CNTs recouverts de SDS et la membrane externe cellulaire ne sont pas observées.

Les CNTs dispersés par le CTAB donnent les plus faibles signaux photothermiques comparés aux autres échantillons (**Figure IV-15 ligne V** et **Tableau IV-1**). Nous constatons des signaux photothermiques de CNTs individualisés d'une longueur comprise entre 200 et 1000 nm (**Figure IV-15 j**) et la présence possible d'agrégats.

Les signaux photothermiques les plus intenses sont retrouvés pour les CNTs dispersés avec le PE-PEG 920 (**Figures IV-15 Ligne II** et **Tableau IV-1**). Les cellules COS7 sont recouvertes uniformément par les CNTs.

Les CNTs dispersés dans le Brij78 donnent également de forts signaux photothermiques, moins intenses cependant que ceux des CNTs dispersés par le PE-PEG (**Figure IV-15 Ligne III** et **Tableau IV-1**). La **Figure IV-15 f**) est l'image de la **Figure IV-15 e**) dans un plan focal différent. Il y a moins de fixation non spécifique avec l'utilisation du Brij 78 qu'avec l'emploi de PE-PEG 920. Il semble que la proportion d'oxyde d'éthylène joue sur l'adhésion des CNTs aux cellules, le Brij 78 comportant une chaîne plus longue que celle du PE-PEG 920. Les CNTs dispersés par le Brij 78 sont peut être plus « furtifs » que les CNTs dispersés par le PE-PEG 920.

Les CNTs dispersés par ces deux tensioactifs ont dans tous les cas une forte adhésion non spécifique aux cellules. Il est possible que ces tensioactifs présentent une chaîne hydrophile trop courte, ou bien sont adsorbés à la surface des CNTs avec une énergie trop faible. Des études menées sur la vectorisation de CNTs par Liu *et al.* indiquent que la longueur des

chaînes de PEG a une influence sur la durée de vie de ces objets dans la circulation sanguine [Liu]. Il serait intéressant de disperser des CNTs avec des tensioactifs présentant une chaîne PEG plus longue afin de vérifier ces hypothèses.

Ces tests photothermiques indiquent une fixation non spécifique importante des CNTs longs sur les cellules pour tous les systèmes dispersifs utilisés. De façon surprenante, les CNTs dispersés par CTAB, tensioactif cationique, sont ceux présentant les plus faibles signaux photothermiques, donc la plus faible fixation non spécifique, alors que la membrane externe cellulaire est chargée négativement. Ces CNTs recouverts de CTAB devraient avoir de plus fortes interactions électrostatiques avec la membrane que les autres CNTs.

3.7 FONCTIONNALISATION DE SWCNTs ULTRACOURTS

Bien que les tests photothermiques montrent une forte fixation non spécifique des CNTs longs aux cellules, il est intéressant de vérifier si tel est le cas avec des CNTs ultracourts.

Compte tenu de la lourdeur et de la complexité des expériences, l'ensemble des systèmes n'a pas pu être encore testé. Pour un premier test avec des CNTs courts, notre choix s'est porté sur le système CTAB car c'est celui qui a donné les meilleurs résultats avec des CNTs longs, c'est-à-dire la plus faible adsorption non spécifique.

3.7.1 PROTOCOLE DE COUPLAGE

Les CNTs ultracourts bruts dispersés dans le CTAB sélectionnés sont issus de la fraction D obtenue après DGU (voir **Chapitre III p. 89**).

Les quantités de réactifs (EDC et anticorps) sont déterminées à partir de la surface d'un nanotube de carbone mesurant 20 nm de long (voir **Annexe VII p. 124**) et pour un ratio anticorps/CNT de 1/1.

La fraction D est mise en réaction avec 41 ng d'EDC pendant 5 min avant ajout de 19,1 µg d'Ac. Le mélange réactionnel est agité pendant 2h, puis centrifugé à 45000 rpm pendant 10 min.

Le surnageant est mis en incubation avec les cellules selon le protocole décrit **p. 104** puis les cellules sont observées au microscope photothermique.

3.7.2 ANALYSES PHOTOTHERMIQUES

La **Figure IV-16** présente les résultats obtenus en imagerie photothermique pour des CNTs ultracourts dispersés dans le CTAB.

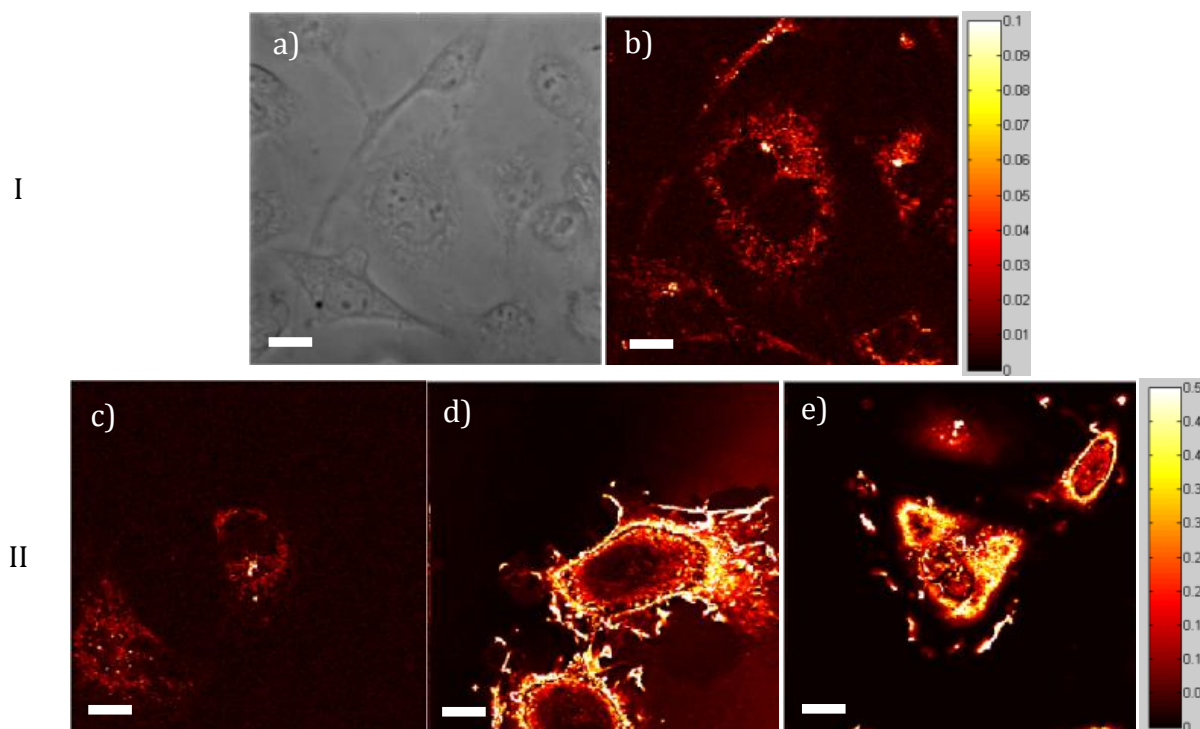


Figure IV-16 : I : cellules COS7 : a) cliché confocal et b) image photothermique ; II : images photothermiques de c) cellules COS7 et CNTs ; d) et e) cellules COS7 et complexes anticorps-CNTs ultracourts. Plusieurs zones des échantillons ont été imagées à chaque fois. La barre des échelles est de 10 μm .

La **Figure IV-16 b)** est une image photothermique contrôle des cellules COS7. Comme signalé précédemment, les signaux photothermiques sont dus aux mitochondries du cytoplasme.

La **Figure IV-16 c)** est une image photothermique des cellules COS7 et des CNTs ultracourts sans anticorps après incubation et lavage. Elle ne présente pas de signal photothermique autre que celui des mitochondries, contrairement aux résultats obtenus avec les CNTs longs. Il n'y a pas d'adsorption non spécifique des nanotubes sur les cellules.

Les CNTs ultracourts couplés au Panitumumab et incubés avec des cellules COS7 sont présentés sur les images photothermiques (**Figures IV-16 d) et e)**). Le signal photothermique des CNTs est intense et réparti sur toute la surface des cellules, indiquant le couplage des CNTs aux cellules COS7 via l'anticorps Panitumumab.

La stratégie de couplage spécifique du complexe anticorps-CNTs sur les cellules semble donc fonctionner pour des CNTs ultracourts. La longueur des nanotubes de carbone semble jouer

un rôle important sur leur fixation non spécifique aux cellules. Ces effets de longueur sont observés pour des CNTs longs, ceux-ci se fixant aux cellules bien qu'étant non fonctionnalisés par des anticorps (voir **p. 108**). Ce n'est pas le cas ici avec des CNTs courts d'une longueur inférieure à 20 nm. D'autres tests sont en cours afin de vérifier ces hypothèses.

Il serait intéressant de vérifier le couplage de CNTs ultracourts dans des systèmes autres que le CTAB. Des tests sont en cours afin de vérifier ces hypothèses.

4 BILAN DU CHAPITRE IV

L'oxydation des CNTs par traitement à l'acide nitrique, en plus d'améliorer la scission des CNTs, est compatible avec un suivi par photothermie. Malgré des signaux d'absorbance fortement dégradés, ces systèmes possèdent des signaux photothermiques intenses largement suffisants et adaptés à l'application biologique envisagée.

Nous avons montré dans ce chapitre que les CNTs ont cependant une forte adhésion pour les membranes cellulaires, non spécifique, bien que dispersés par des tensioactifs présentant des chaînes hydrophiles censées empêcher ce phénomène. Ces constatations laissent penser que l'utilisation d'un tensioactif possédant une plus longue chaîne PEG aurait peut être permis de démontrer la spécificité du couplage CNT-anticorps pour les cellules COS7 en PHI en évitant une trop forte adsorption membranaire.

La longueur des CNTs est également un paramètre important à prendre en compte dans l'adressage de molécules. Nous montrons que les CNTs longs ont une fixation cellulaire non spécifique importante, tandis que les CNTs ultracourts n'ont qu'une fixation spécifique via l'anticorps aux récepteurs de l'EGF des cellules COS7. D'autres tests sont en cours afin de vérifier ces hypothèses. Des études plus poussées et systématiques doivent être menées afin de montrer l'accroche de CNTs ultracourts via l'anticorps aux cellules avec d'autres systèmes de tensioactifs.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Chen, J., Chen, S., Zhao, X., Kuznetsova, L. V., Wong, S. S. & Ojima, I. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 16778-16785 (2008).
- Green, N. M. *Methods Enzymol.* **184**, 51–67 (1990).
- Kam, N. S. W., Jessop, T. C., Wender, P. A. & Dai, H. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 6850-6851 (2004).
- Lasne, D., Blab, G. A., De Giorgi, F., Ichas, F., Lounis, B. & Cognet, L. *Opt. Express* **15**, 14184–14193 (2007).
- Liu, Z. Davis, C., Cai, W., He, L., Chen, X. & Dai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1410 (2008).
- Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y. & Lawrence, T. S. *Nature Reviews Cancer* **6**, 876-885 (2006).
- Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S. & Conklin, E. *Avidin-Biotin Chemistry : A Handbook*, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1-23 (1992).
- Tong, X. & Smith, L. M. *Anal. Chem.* **64**, 2672-2677 (1992).
- Unidym, [www.unidym.com/files/Unidym Product Sheet SWNT_2012_06_13.pdf](http://www.unidym.com/files/Unidym%20Product%20Sheet%20SWNT_2012_06_13.pdf)

Conclusion et perspectives

Nous devons, dans le cadre de ces travaux de thèse, obtenir et caractériser des dispersions stables de nanotubes de carbone courts dispersés dans différents tensioactifs, et de les biofonctionnaliser afin de les utiliser comme nouveau marqueur proche infrarouge.

Nous nous sommes dans un premier temps focalisés sur la préparation de nanotubes de carbone ultracourts par applications d'ultrasons et/ou traitement oxydatif. Plusieurs dispersions de CNTs ont été réalisées avec différents tensioactifs. Le tri par ultracentrifugation en gradient de densité nous a permis de sélectionner les nanotubes en fonction de leur longueur selon un procédé aisé, fiable et reproductible. Les nanotubes ainsi obtenus sont d'une longueur inférieure à 20 nm, et rentrent dans le cahier des charges défini au préalable. Ces nanotubes ont été caractérisés par spectroscopie d'absorbance UV-Visible-proche infrarouge, spectroscopie Raman et microscopie à force atomique. Les quantités de nanotubes ultracourts obtenues sont loin d'être négligeables, de l'ordre de plusieurs microgrammes par millilitre, concentrations suffisantes pour mener à bien des tests biologiques.

Nous avons également montré dans un deuxième temps la biofonctionnalisation covalente de nanotubes de carbone par des anticorps monoclonaux et un dérivé de la biotine. Des analyses photothermiques ont montré que des nanotubes de carbone longs s'adsorbent de façon non spécifique aux membranes cellulaires, et ce, en grandes quantités. Cependant, des tests photothermiques effectués avec des nanotubes de carbone ultracourts indiquent leur fixation spécifique aux cellules via leur biofonctionnalisation par des anticorps monoclonaux. Des effets de longueur de nanotubes sont peut être mis en jeu et des tests plus poussés doivent être menés afin de mettre en évidence ce phénomène.

Perspectives

Cette thèse ouvre de nombreuses perspectives de recherche.

Un point intéressant serait de mener des tests poussés afin de caractériser les effets de longueur observés lors des tests d'imagerie photothermique sur cellules. Plusieurs gammes de longueur de CNTs définies pourraient ainsi être caractérisées afin de déterminer la longueur à partir de laquelle il n'y a plus de spécificité pour les membranes cellulaires.

De plus, la préparation de dispersions de CNTs avec des tensioactifs présentant des chaînes de PEG plus longues permettrait certainement d'accroître la furtivité de ces systèmes. Une augmentation de la furtivité des CNTs nous laisserait envisager la faisabilité de futurs tests biologiques avec des anticorps spécifiques des récepteurs post-synaptiques, et au final d'imager leur plasticité. Il faut cependant tenir compte des dimensions d'une synapse pour ne pas créer de systèmes trop gros qui ne pénétreront pas à l'intérieur de celle-ci.

Les CNTs ultracourts sont également des nano-objets de bioimagerie très prometteurs. Des études sur leur cytotoxicité et leur biocompatibilité doivent néanmoins être menées. Des tests sur cellules vivantes sont à envisager dans un avenir proche.

A terme, nous espérons que l'ensemble de ces travaux permettra de développer une nouvelle classe de marqueurs biocompatibles.

Annexe I

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

AFM : Microscopie à force atomique

ATG : Analyse thermogravimétrique

CCFs : Fragments carbonés carboxylés

CNT : Nanotube de carbone

CoMoCAT : Catalyseurs à base de cobalt et de molybdène

CTAB : bromure de cetyltriméthylammonium

DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DGU : Ultracentrifugation en gradient de densité

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

FFF : Field-flow fractionation

GO : Graphène oxydé

HiPCO : High pressure carbon monoxyde

HOBt : Hydroxybenzotriazole

MALS : Multiangle light scattering

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

MWCNT : Nanotube de carbone multi-parois

NHS : N-hydroxysuccinimide

PAA : Poly(acide acrylique)

PBS : Tampon phosphate salin

PHI : Imagerie photothermique hétérodyne

RBM : Mode de respiration radiale

RGO : Graphène oxydé réduit

SBM : Poly(styrène)-b-poly(butadiène)-b-poly(méthylméthacrylate)

SC : Cholate de sodium

SDBS : Dodécylsulfobenzène de sodium

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

Sulfo-NHS : N-hydroxysulfosuccinimide

SWCNT : Nanotube de carbone mono-paroi

US : Ultrasons

Annexe II

Calcul du taux de fonctions COOH pour les nanotubes bruts

La perte de masse est déterminée par les mesures ATG présentées dans le **Chapitre III** de ce manuscrit.

La perte de masse W_0 entre 150°C et 350°C pour les nanotubes bruts correspond à :

$$W_0 = W_{350^\circ\text{C}} - W_{150^\circ\text{C}} = 9,23 \%$$

Avec $W_{150^\circ\text{C}}$ et $W_{350^\circ\text{C}}$ les pertes de masse à 150°C et 350°C sous argon.

Le pourcentage de fonctions liées aux fonctions COOH est donné par la formule :

$$\left(\frac{W_0}{100 - W_0} \times 100 \right)$$

Soit :

$$\left(\frac{9,23}{100 - 9,23} \times 100 \right) = 10,17 \%$$

Il y a 10,17 g de fonctions COOH pour 100 g de carbone. On peut alors déterminer le nombre de moles de fonctions carboxyliques correspondantes $n_{\text{COOH}} = \frac{10,17}{45} = 0,226$ moles et le nombre de moles de carbone $n_{\text{C}} = \frac{100}{12} = 8,333$ moles.

Ainsi la quantité de groupements COOH pour 100 atomes de carbone est de :

$$\frac{n_{\text{COOH}}}{n_{\text{C}}} = \frac{0,226}{8,333} \times 100 = 2,71 \%$$

Les nanotubes bruts présentent 2,71 groupements carboxyliques pour 100 atomes de carbone, ce qui représente une fonction COOH tous les 14 cycles.

Calcul du taux de fonctions COOH pour les nanotubes oxydés à l'acide nitrique

La perte de masse W_0 entre 150°C et 350°C pour les nanotubes bruts correspond à :

$$W_0 = W_{350^\circ\text{C}} - W_{150^\circ\text{C}} = 12,88 \%$$

Le pourcentage de fonctions liées aux fonctions COOH est donné par la formule :

$$\left(\frac{W_1}{100 - W_1} \times 100 \right)$$

Soit :

$$\left(\frac{12,88}{100 - 12,88} \times 100 \right) = 14,78 \%$$

Il y a 14,78 g de fonctions COOH pour 100 g de carbone. On peut alors déterminer le nombre de moles de fonctions carboxyliques correspondantes $n_{COOH} = \frac{14,78}{45} = 0,328$ moles et le nombre de moles de carbone $n_C = \frac{100}{12} = 8,333$ moles.

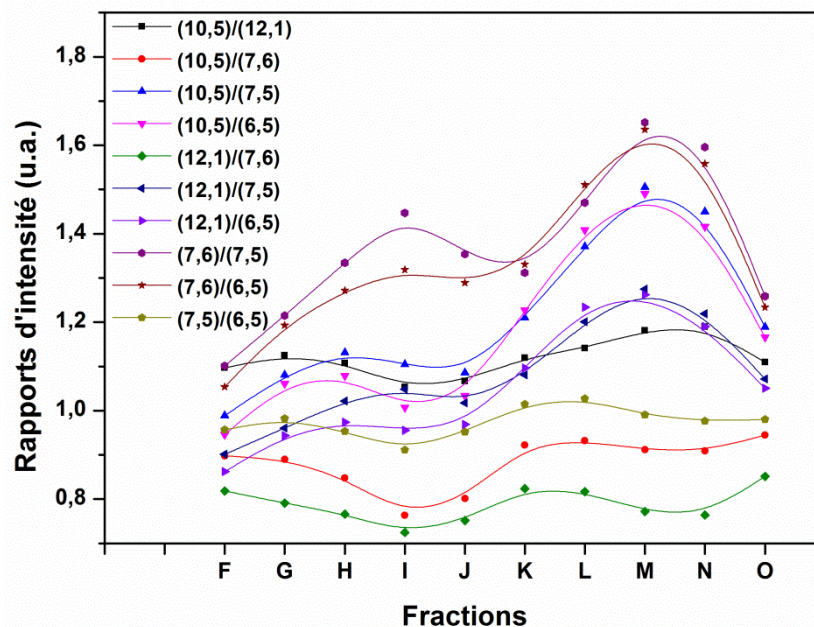
Ainsi la quantité de groupements COOH pour 100 atomes de carbone est de :

$$\frac{n_{COOH}}{n_C} = \frac{0,328}{8,333} \times 100 = 3,94 \%$$

Les nanotubes oxydés présentent 2,71 groupements carboxyliques pour 100 atomes de carbone, ce qui représente une fonction COOH tous les 9-10 cycles.

Annexe III

Rapports d'intensité par spectroscopie d'absorbance de fractions CNTs bruts dispersés dans les sels biliaires ($P_{US} = 6W$, $T_{US} = 5h$) après DGU



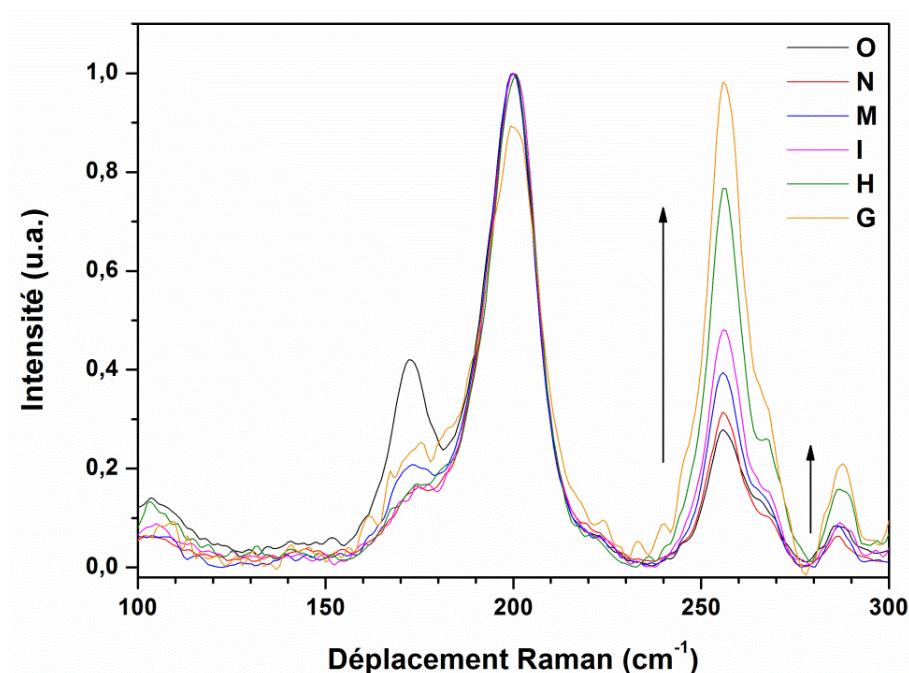
Les rapports d'intensité entre chiralités sont faits après normalisation entre 0 et 1 des spectres d'absorbance de chaque fraction.

Il est remarqué un enrichissement de certaines fractions pour certaines chiralités. Ainsi, les fractions basses sont enrichies en CNTs (7,6), (10,5) et (12,1) comparés aux autres chiralités.

Il existe un tri des CNTs selon leur chiralité en même temps que le tri selon leur longueur pendant le processus de DGU pour des CNTs bruts.

Annexe IV

Spectroscopie Raman à 638 nm des RBM sur des fractions de CNTs oxydés après DGU



Les signaux Raman sont normalisés entre 100 cm^{-1} et 300 cm^{-1} par le signal RBM le plus intense pour chaque fraction.

Il est constaté un pic à 170 cm^{-1} au niveau de la fraction O (en noir sur la figure), qui correspond à une accumulation de CNTs de gros diamètre au niveau de cette fraction comparée aux autres.

Il est également remarqué un enrichissement en CNTs de plus faible diamètre pour les fractions hautes du tube d'ultracentrifugation (pics situés à 258 cm^{-1} et 287 cm^{-1}).

Cette caractérisation indique qu'il existe un tri des CNTs selon leur diamètre en même temps que le tri selon leur longueur pendant le processus de DGU pour des CNTs oxydés.

Annexe V

Séquence peptidique de l'anticorps Panitumumab

Le Panitumumab est composé de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères dont la séquence est indiquée ci-dessous. Les acides aminés basiques susceptibles d'occasionner des réactions d'amidation avec les CNTs sont indiqués en rouge.

Chaîne lourde :

QVQLQESGPGGLV**K**PSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPG**K**GLEWIGHIYYSGNTNYPN**S**L**K**
RLTISIDTS**K**TQFSL**K**LSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMTVSSAST**K**GPSVFPLAPCSR
STSESTAALGCLV**K**DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTC
NVDH**K**PSNT**K**VD**K**TVER**K**CCVECPPCAPPVAGPSVFLFPP**K**P**K**DTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVQFNWYVDGVEVHNA**K**T**K**PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG**K**EY**K**CKVSN**K**GLPAPIE**K**
TIS**K**T**K**GQPREPQVYTLPPSREEMT**K**NQVSLTCLV**K**GFYPSDIAVEWESNGQPENNY**K**TPPMLDS
DGSFFLYS**K**LTVD**K**SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ**K**SLSLSPG**K**

Chaîne légère :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQ**K**PG**K**AP**K**LLIYDASNLETGVPSRFSGSGSG
TDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFHDLPLAFGGGT**K**VEI**K**RTVAAPSVFIFPPSDEQL**K**SGTASVVCLLN
NFYPREA**K**VQW**K**VDNALQSGNSQESVTEQDS**K**DSTYLSSTLTLS**K**ADYE**K**HKVYACEVTHQGLSS
PVT**K**SFNRGEC

Annexe VI

Nomenclature des acides aminés

Nom complet de l'acide aminé	Code à une lettre
Alanine	A
Arginine	R
Asparagine	N
Aspartate	D
Cystéine	C
Glutamate	E
Glutamine	Q
Glycine	G
Histidine	H
Isoleucine	I
Leucine	L
Lysine	K
Méthionine	M
Phénylalanine	F
Proline	P
Sérine	S
Thréonine	T
Tryptophane	W
Tyrosine	Y
Valine	V

Annexes VII

Biofonctionnalisation de CNTs oxydés par la biotine

Quantités de réactifs à ajouter pour fonctionnaliser 5 µg de CNTs par 10 biotines pégylées :

	EDC	Sulfo-NHS	Biotine pégylée
Masse molaire (en g.mol ⁻¹)	155,24	217,13	683
Masse (en ng)	61,5	86	180
Volume à ajouter (en µL)	9,9	13,9	29
Nombre d'équivalents ajoutés	15	15	10

Biofonctionnalisation de CNTs par l'anticorps

Quantités de réactifs à ajouter pour fonctionnaliser 5 µg de CNTs selon le rapport CNT/Ac et la longueur des CNTs :

	Ratio CNT/anticorps = 1		Ratio CNT/anticorps = 10	
Longueur CNTs (nm)	EDC (ng)	Ac (µg)	EDC (ng)	Ac (µg)
20	20,5	19,1	2,05	1,91
100	4,1	3,81	0,41	0,381

Annexes VIII

Tests de conductivité

Solution aqueuse contenant :	Conductivité ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)
1% SDS	1060
0,07 % PE-PEG 920	3,15
CNTs après dialyse PE-PEG 920	28,6
CNTs bruts	46

Nanotubes de carbone ultracourts pour la bioimagerie

Résumé : Les travaux de recherche effectués lors de cette thèse portent sur l'obtention de nanotubes de carbone ultracourts et leur biofonctionnalisation pour une utilisation comme biomarqueur proche infrarouge. Des dispersions de nanotubes de carbone en milieux aqueux ont été formulées à l'aide de différents tensioactifs. Un traitement chimique oxydant préalable et/ou l'application d'ultrasons aux nanotubes ont permis de réduire leur longueur de façon significative, la sélection des plus courts étant effectuée par ultracentrifugation en gradient de densité. Les différentes fractions sélectionnées à l'issue de ce processus ont été caractérisées par spectroscopie Raman et spectroscopie d'absorption ainsi que par microscopie à force atomique. Il est ainsi montré la sélection de nanotubes d'une longueur inférieure à 20 nm. Nous montrons également leur fonctionnalisation à l'aide d'anticorps monoclonaux et leur visualisation par imagerie photothermique hétérodyne. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec la fixation spécifique de nanotubes de carbone ultracourts sur des cellules. Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives en bioimagerie et en particulier l'étude de la plasticité synaptique au sein de neurones vivants.

Mots clés : nanotubes de carbone, ultracourts, bioimagerie, dispersion, imagerie photothermique hétérodyne, microscopie à force atomique, spectroscopie d'absorption, spectroscopie Raman, traitement chimique oxydant, biofonctionnalisation.

Ultrashort carbon nanotubes for bioimaging applications

Abstract : This thesis reports the achievement of ultrashort carbon nanotubes and their biofunctionalization for applications as near-infrared biomarker. Dispersions of carbon nanotubes in aqueous media have been formulated with various surfactants. Oxidizing chemical treatments combined with the application of ultrasounds allowed significant shortening of the carbon nanotubes. Sorting and selection of the shortest nanotubes was done by density gradient ultracentrifugation. The different fractions selected at the end of this process have been characterized by Raman spectroscopy, UV-vis absorption spectroscopy and atomic force microscopy. Selection of nanotubes of a length below 20 nm is demonstrated. We also show functionalization by antibodies and the visualization of ultrashort functionalized nanotubes by photothermal heterodyne imaging. Promising results were obtained with the specific binding of ultrashort carbon nanotubes to cells. This work open route towards bioimaging applications and in particular towards the study of the synapsis plasticity within alive neurons.

Keywords : carbon nanotubes, ultrashort, bioimaging, dispersion, photothermal heterodyne imaging, atomic force microscopy, absorption spectroscopy, Raman spectroscopy, oxidizing chemical treatment, biofunctionalization.

Unité de recherche

Centre de Recherche Paul Pascal, UPR 8641, 115 Av. Schweitzer, 33600 Pessac